

**Bioprozessentwicklung filamentöser Pilze**  
**anhand**  
**automatisierter Morphologieuntersuchung**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Lars-Roland Bruno Walter Günter Freund  
aus Heidelberg

1. Referent:	apl. Professor Dr. Udo Rau
2. Referent:	Professor Dr. Karsten Hiller
eingereicht am:	15.05.2020
mündliche Prüfung (Disputation) am:	17.07.2020

Druckjahr 2020

## **Vorabveröffentlichungen**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Freund, L., Rau, U.: Opportunities in the cultivation of non-sporulating filamentous fungi by morphology control. (Poster) World Biotechnology Congress, Boston (2013)

Meiner Tochter Emily



## Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik in der Arbeitsgruppe Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. Udo Rau danke ich für die Möglichkeit, dass ich die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Die sehr konstruktiven Diskussionen, Ihre kreativen Anregungen, Ihre ständige Unterstützung und insbesondere die sehr vertrauensvoll gewährten Freiheiten haben dazu geführt, dass ich stetig neue Ideen entwickeln konnte. Zudem danke ich Ihnen für die Teilnahme an Dienstreisen ins Ausland und zu Projektmeetings.

Herrn Prof. Dr. Karsten Hiller danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Prof. Dr. Michael Hust für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Besonderer Dank geht auch an Wolfgang Graßl, der mir bei technischen Fragen immer zur Seite stand und mich tatkräftig bei Arbeitsvorbereitungen und Versuchen im Biotechnikum unterstützte. Neben seinem technischen Sachverstand habe ich insbesondere seine stets konstruktive Art und allgegenwärtige Hilfsbereitschaft sehr zu schätzen gewusst.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Studenten bedanken, die im Rahmen von Literatur- und insbesondere Bachelorarbeiten oder Hiwi-tätigkeiten mitgeholfen haben, meine Ideen und Entwicklungen voranzubringen. Euch Kirsten Ullmann, Sonja Horn, Wenzel Wellenbeck und Lukas Rottschäfer danke ich herzlich für die Unterstützung, insbesondere bei der Morphologieuntersuchung am Mikroskop.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Partikeltechnik IPAT und des Instituts für Bioverfahrenstechnik Ibvt für die technische Unterstützung bei der Partikelgrößenanalyse am Laserbeuger (IPAT) und den Kryoschnitten von *S. commune* (ibvt). Durch Euch konnte ich viele Fortschritte, schneller als es zu erwarten wäre, realisieren.

Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die immerwährende moralische Unterstützung in gemeinsamen Kaffeerunden bedanke ich mich bei Linda Kilian, Ileana Jurchescu, Stefanie Wöhl-Bruhn, Sven Bergmann, Verena Recke und Malte Ringleb. Die Freude bei der Arbeit im Kollegenkreis wird mir immer in guter Erinnerung

bleiben. In gleicher Weise danke ich den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biotechnologie.

Herzlichen Dank auch an meine Eltern für ihre Unterstützung und viele Freiheiten.

Meiner Frau Anna danke ich für die Unterstützung, Ermutigung, Motivation und ihren Antrieb, die meine Arbeit stets mit Freude begleitet und erleichtert haben.

Titisee-Neustadt, April 2020

Lars Freund

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	S.	1
1.1	Die Morphologie von Pilzen.....	S.	1
1.2	<i>Schizophyllum commune</i> und seine Eigenschaften.....	S.	2
1.2.1	Struktur, Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten $\beta$ -1,6-verzweigter $\beta$ -1,3-D-Glucane.....	S.	2
1.3	Kultivierung filamentöser Pilze.....	S.	4
1.3.1	Kultivierung von <i>Schizophyllum commune</i> .....	S.	6
1.4	Entwicklung der Morphologieanalyse.....	S.	8
1.5	Beeinflussung der Morphologie filamentöser Pilze.....	S.	11
1.6	Statistische Versuchsplanung und multivariate Datenanalyse.....	S.	12
1.7	Zielsetzungen.....	S.	18
2	Material und Methoden.....	S.	20
2.1	Stammhaltung von <i>Schizophyllum commune</i> und <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	S.	20
2.2	Kultivierung in Flüssigkultur.....	S.	21
2.2.1	Medienzusätze.....	S.	24
2.2.1.1	Größenbestimmung von Talkmikropartikeln mittels Laserbeugung.....	S.	25
2.2.2	Konzentriertes Medium.....	S.	26
2.3	Mikroskopie und Bildauswertung.....	S.	26
2.3.1	Manuelle Mikroskopie.....	S.	26
2.3.2	Mikroskopie im Durchfluss.....	S.	27
2.3.3	Automatische Bildverarbeitung.....	S.	30
2.3.4	Pelletkonzentrationsbestimmung.....	S.	32
2.4	Entwicklung eines reproduzierbaren Kultivierungsverfahrens....	S.	33
2.4.1	Statistische Versuchsplanung.....	S.	36
2.4.2	Homogenisierung von Luftmycel und Kultursuspension.....	S.	39

2.5	Analytische Bestimmungen.....	S.	41
2.5.1	Probenvorbereitung.....	S.	41
2.5.2	Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse.....	S.	42
2.5.3	Gravimetrische Polysaccharidbestimmung.....	S.	42
2.5.4	Bestimmung der Glucosekonzentration mit Dinitrosalicylsäure (DNS).....	S.	43
3	Ergebnisse.....	S.	45
3.1	Reproduzierbarkeit der Kultivierungsführung.....	S.	45
3.2	Morphologiebeeinflussung.....	S.	58
3.2.1	Morphologie in Abhängigkeit der Inokulumkonzentration...	S.	58
3.2.1.1	Beimpfen mit Luftmycel.....	S.	58
3.2.1.2	Beimpfen mit Kultursuspension.....	S.	63
3.2.1.3	Grauwert und Pelletdichte in Abhängigkeit der Inokulumkonzentration.....	S.	68
3.2.1.4	Pelletoberfläche und Polysaccharidbildung.....	S.	72
3.2.2	Einfluss der Schüttelfrequenz und Glucosekonzentration...	S.	76
3.2.3	Einfluss von Medienzusätzen.....	S.	77
3.2.3.1	Einfluss von Mikropartikeln.....	S.	78
3.2.3.1.1	Talkpartikel.....	S.	80
3.2.3.1.2	Erzeugung großer Pellets mit Talkpartikeln.....	S.	84
3.2.3.2	Einfluss von Mikropartikeln auf die Morphologie von <i>S. rolfsii</i> .....	S.	86
3.2.3.3	Einfluss der Salzkonzentration.....	S.	88
3.2.3.4	Einfluss der Komplexmediumkonzentration.....	S.	88
3.2.4	Einfluss der Homogenisierung des Inokulums.....	S.	94
3.2.4.1	Spezifischer Ertrag in Abhängigkeit von Homogenisierung und Morphologie.....	S.	100
3.2.4.2	Homogenisierung von inhomogener Vorkultur.....	S.	104

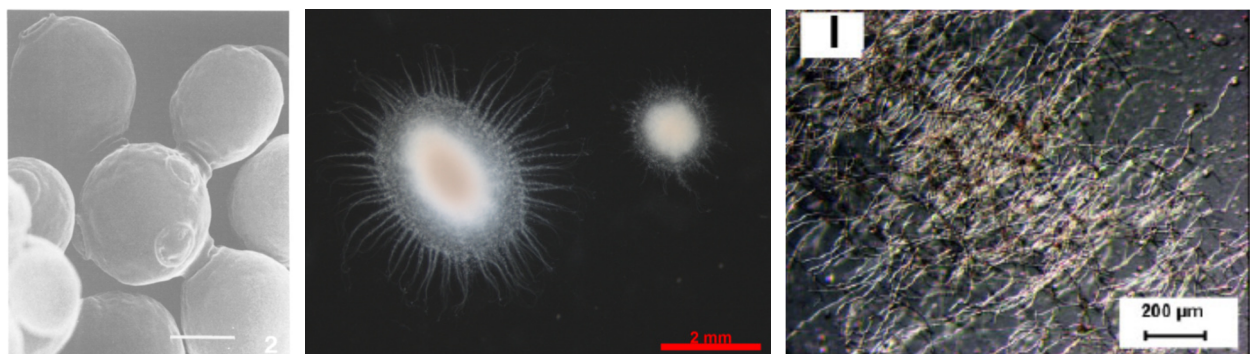
3.2.5	Einflüsse des Scale-up auf die Morphologie.....	S. 106
3.3	Automatisierung der Mikroskopie.....	S. 107
3.3.1	Validierung und Optimierung der Automatisierung.....	S. 114
3.3.2	Automatisierung der Pelletkonzentrationsbestimmung.....	S. 117
3.4	Kinetik der morphologischen Entwicklung.....	S. 118
3.4.1	Morphologische Parameter im Kultivierungsverlauf.....	S. 119
3.4.2	Vergleich von Produktivität und Morphologie.....	S. 120
3.4.3	Abschätzung der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf mit Hilfe morphologischer Parameter.....	S. 124
4	Diskussion.....	S. 134
4.1	Reproduzierbare Kultivierungsführung.....	S. 134
4.2	Beeinflussung der Morphologie.....	S. 136
4.3	Automatisierung der Mikroskopie.....	S. 150
4.4	Polysaccharidbildung bei reproduzierbarer Morphologie.....	S. 155
I	Zusammenfassung.....	S. 163
II	Abstract.....	S. 165
III	Literatur.....	S. 166
IV	Abkürzungsverzeichnis.....	S. 175
V	Anhang.....	S. 177

# 1 Einleitung

Der Begriff Morphologie leitet sich aus den griechischen Wörtern *morphé* und *lógos* ab und bedeutet übersetzt „Lehre von der Form“. Dieser Ausdruck wurde von Johann Wolfgang von Goethe eingeführt, der ihn zur Beschreibung und Unterscheidung von Individuen einsetzte. Der Begriff wurde zeitgleich auch von Karl Friedrich Burdach geprägt (Burdach 1817; von Goethe 1817).

## 1.1 Die Morphologie von Pilzen

Pilze sind morphologisch sehr vielfältig. Sie kommen als Hefen vor, die mikroskopisch klein sind oder bilden abhängig vom Stamm Strukturen aus, die aus einem Hyphengeflecht bestehen (Wendland 2001). Die erste Unterscheidung zwischen verschiedenen Wachstumsformen, die daher vorgenommen wird, ist die zwischen Hefen und den filamentös wachsenden Pilzen (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Links: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), Maßstab gibt eine Länge von  $2 \cdot 10^{-3}$  mm an (Pringle et al. 1979). Mitte: Stereomikroskopische Aufnahme von Pellets von *Schizophyllum commune*, Maßstab gibt eine Länge von  $2 \cdot 10^0$  mm an. Die Aufnahme erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Rechts: Stereomikroskopische Aufnahme von Mycel des Stamms *Aspergillus niger* SKAn1015, Maßstab gibt eine Länge von  $2 \cdot 10^{-1}$  mm an (Driouch et al. 2010).

Filamentös wachsende Pilze kommen in zwei verschiedenen morphologischen Ausprägungen vor. Entweder sie wachsen als kompaktes Hyphengeflecht (Pellets) mit eindeutiger Abgrenzung zu weiteren Pellets (siehe Abb. 1.1, Mitte) oder sie wachsen ohne diese Abgrenzung in diffuser Form über das gesamte Medium verteilt (mycelförmiges Wachstum; siehe Abb. 1.1, rechts).

## 1.2 *Schizophyllum commune* und seine Eigenschaften

*S. commune* ist ein filamentös wachsender, nicht-sporulierender Basidiomycet, der ein  $\beta$ -1,6-verzweigtes  $\beta$ -1,3-D-Glucan ((1,3-1,6)- $\beta$ -Glucan) sekretiert. Dieses Exopolysaccharid wird nach seinem Produzenten als Schizophyllan bezeichnet und besitzt aufgrund seiner Struktur einige einzigartige Verwendungsmöglichkeiten (Kap. 1.2.1).

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm wurde durch die Fusion von zwei Monokaryen generiert. Dazu wurden aus dem Dikaryon des Stamms *S. commune* DSM 3888 die Monokaryen Protoklon A und Protoklon B isoliert. Durch Kreuzung des monokaryontischen Stamms *S. commune* ATCC 36481 mit Protoklon B wurde der dikaryontische Stamm *Schizophyllum commune* DSM 6320 gebildet, der sich durch eine erhöhte Schizophyllansekretion auszeichnet (Prokop et al. 1992).

*Sclerotium rolfii* ist ebenfalls ein filamentös wachsender Basidiomycet (Narayanan and Sakthivel 2011). *S. rolfii* sekretiert ein dem Schizophyllan analoges Exopolysaccharid. Analog zur Nomenklatur des Schizophyllans wird dieses Polysaccharid Scleroglucan genannt.

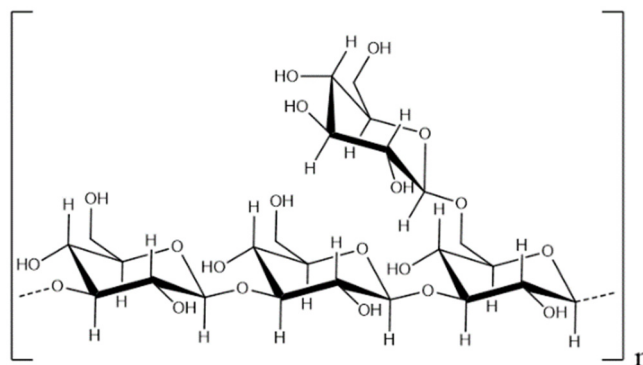
### 1.2.1 Struktur, Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten $\beta$ -1,6-verzweigter $\beta$ -1,3-D-Glucane

Scleroglucan eignet sich unter 140 getesteten Polymeren, darunter auch Xanthan, am besten als Schmiermittel und für die tertiäre Erdölförderung (Davison and Mentzer 1982; Lange and Keilhofer 2004). Im pharmazeutischen Bereich werden (1,3-1,6)- $\beta$ -Glucane nicht nur auf ihre Wirksamkeit als Immunmodulatoren hin getestet, sondern auch hinsichtlich einer Verwendung als Matrix für eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung (Coviello et al. 2005). Auch die Bildung von Komplexen der (1,3-1,6)- $\beta$ -Glucane, insbesondere von Schizophyllan, mit einzelsträngigen Polynukleotiden wurde ausführlich untersucht (Mizu et al. 2004; Viñarta et al. 2007). Eine Anwendung als Träger einzelsträngiger DNA-Moleküle in der Antisense-Therapie erscheint möglich, da der Komplex vor der Hydrolyse durch Nukleasen geschützt ist. In der Nahrungsmittelindustrie ist ein Einsatz von (1,3-1,6)- $\beta$ -Glucanen vor allem als Quell- und Verdickungsmittel, als Stabilisator und auch als Emulgator möglich (Viñarta et al. 2007).

Nachfolgend sind Eigenschaften und Verwendungsmöglichkeiten aufgeführt, die auf die native Struktur der (1,3-1,6)- $\beta$ -Glucane zurückzuführen sind. Eine bedeutende Rolle kommt der makromolekularen Struktur des Glucans zu, die wie der Verzweigungsgrad und das Molekulargewicht Einfluss auf die immunmodulatorische Wirkung von Scleroglucan oder Schizophyllan hat (Sletmoen and Stokke 2008). Die immunstimulatorischen Effekte (*in vivo* sowie *in vitro*) der kammartig verzweigten  $\beta$ -1,3-D-Glucane führen zu antitumoralen (Chihara 1984; Maeda and Chihara 1971; Maeda et al. 1988) sowie antibakteriellen und antiviralen (Pretus et al. 1991) Wirkungen. Auch die Wundheilung kann beschleunigt werden (Aketagawa et al. 1993; Pretus et al. 1991).

Die Struktur von Schizophyllan aus *S. commune* und Scleroglucan aus *S. rolfssii* oder *S. glaucanicum* kann als nahezu identisch angesehen werden (Borchers et al. 2004).

Scleroglucan und Schizophyllan sind in ihrer Primärstruktur identisch (Rinaudo and Vincendon 1982; Tabata et al. 1981) und unterscheiden sich daher unter gleichen Bedingungen (Lösungsmittel, Temperatur, etc.) auch in ihrer Sekundärstruktur kaum (Norisuye et al. 1980; Yanaki and Norisuye 1983). In Abbildung 1.2 ist die Primärstruktur von Scleroglucan und Schizophyllan dargestellt.



**Abb. 1.2:** Primärstruktur einer Untereinheit von Scleroglucan und Schizophyllan.

In Scleroglucan und Schizophyllan beträgt der Verzweigungsgrad ca. 0,33, d.h. an durchschnittlich jeder dritten Glucoseeinheit der Hauptkette tritt eine  $\beta$ -1,6-Verzweigungsstelle auf. Dort ist eine einzelne D-Glycopyranose  $\beta$ -glycosidisch gebunden (Bohn and BeMiller 1995). Die gewichtsmittlere Molmasse liegt, vorausgesetzt es wurden keine chemischen Modifizierungen vorgenommen, für Scleroglucan bei Aufreinigung aus *S. rolfssii* bei  $2,9 \cdot 10^6$  g/mol und bei Isolierung aus *S. glaucanicum* bei  $1,4 \cdot 10^6$  g/mol (Kulicke et al. 1996). Für Schizophyllanpräparationen, die in Japan zur unterstützenden Tumorbehandlung verwendet werden, beträgt die



gewichtsmittlere molare Masse  $5,5 \cdot 10^5$  g/mol (Kulicke et al. 1996). An anderer Stelle wird für Schizophyllan eine gewichtsmittlere Molmasse von  $5,7 \cdot 10^5$  g/mol angegeben (Norisuye et al. 1980). In wässriger Lösung liegt bei 25 °C eine Tripelhelix vor (Bluhm et al. 1982; Lecacheux et al. 1986; Norisuye et al. 1980; Yanaki et al. 1983). Je Helixwindung treten sechs  $\beta$ -1,6-Verzweigungen auf, die nach außen zeigen. Im Inneren wird die Tripelhelix durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten (Bluhm et al. 1982).

Die (1,3-1,6)- $\beta$ -Glucane haben eine hohe Temperaturstabilität. Die Tripelhelix einer wässrigen Schizophyllan-Lösung denaturiert erst bei einer Temperatur von 135 °C in Einzelstränge (Yanaki et al. 1985). Bei Untersuchungen von Scleroglucan wurde zudem eine hohe Thermostabilität über längere Zeit festgestellt. Eine Temperatur von 120 °C hat auch nach 20 Stunden keinen Einfluss auf die Struktur (McIntire and Brant 1998; Noik and Lecourtier 1993). Zudem löst sich das Polymer in Wasser. Die entstandene Lösung besitzt pseudoplastisches Fließverhalten (Bluhm et al. 1982).

Von Bluhm et al. (1982) wurden auch Untersuchungen zur Abhängigkeit der Viskosität vom pH-Wert und der Temperatur vorgenommen. Die Viskosität ist dabei in einem pH-Bereich von 0,5 bis 12 konstant, bei einem pH-Wert größer 12 fällt sie stark ab, da sich die rigide Tripelhelix auflöst und Einzelstränge entstehen.

### 1.3 Kultivierung filamentöser Pilze

Filamentöse Pilze sind gut geeignete Produzenten von Sekundärmetaboliten. Sie werden zum Beispiel in der pharmazeutischen Produktion zur Herstellung von Antibiotika eingesetzt. Auch zur Enzymproduktion werden sie vermehrt genutzt (Papagianni 2004).

Bekannte Produkte sind unter anderem Antibiotika wie Penicillin (*Penicillium chrysogenum*) oder Cephalosporin (*Cephalosporium acremonium*), Zitronensäure (*Aspergillus niger*), weitere organische Säuren wie Itaconsäure (*Aspergillus terreus*) oder beispielsweise auch Statine wie Lovastatin (*Aspergillus terreus*) sowie Enzyme, beispielsweise Laccasen (*Botrytis cinerea*) und Xylanasen (*Aspergillus nidulans*), die zur Bleichung von Textilfarben oder von Pulpe in der Papierindustrie eingesetzt werden, oder auch Lipasen (*Thermomyces lanuginosus*) und Proteasen (*Phlebia radiata*), die in Waschmitteln verwendet werden (Bizukojc and Ledakowicz 2010; Bo

2000; Cabaleiro et al. 2002; Fernandez-Lafuente 2010; Fleming 1929; Papagianni 2004, 2007; Polizeli et al. 2005; Slomczynski et al. 1995). Pilze sind gut geeignete Produzenten, da sie über entsprechende Stoffwechselwege verfügen und posttranslationale Modifizierungen ausführen, sodass Enzyme mit der erforderlichen Glykosylierung versehen werden können. Dies macht sie zu attraktiven Organismen für die heterologe Proteinexpression (Cabaleiro et al. 2002). Zusätzlich sind sie in der Lage, entsprechende Produkte in das Medium zu sekretieren, sodass die Aufreinigung erleichtert wird (Willke and Vorlop 2001).

Die größte Herausforderung in der Kultivierung filamentöser Pilze besteht darin, die Morphologie und damit die Produktionseigenschaften reproduzierbar einzustellen – aufgrund der komplexen Interaktionen zwischen verwendetem Stamm, Inokulum, Morphologie, Rheologie und dem Prozess-Design (Posch et al. 2013; Walisko et al. 2012). Posch et al. (2013) zeigen Möglichkeiten für eine kontrollierte Bioprozessentwicklung filamentöser Pilze auf, um die Entwicklungsdauer zu reduzieren und Prozessfehlerraten zu minimieren. Dabei verweisen sie auch auf die Wichtigkeit einer morphologischen Analyse bereits in der Anfangsphase der Stammuntersuchung, da hiervon die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Vorgehensweise für nachfolgende Scale-up-Versuche maßgeblich abhängig sind.

Kultivierungen, die mit Sporen beimpft werden, wie z.B. Kultivierungen von *Aspergillus niger* können durch die Zugabe von ausreichend konzentrierten Sporen im Inokulum direkt in Bioreaktoren größeren Volumens gestartet werden, sodass nur wenige oder keine Vorkultivierungen erforderlich sind (Max et al. 2010). Auch die industrielle Produktion von Itaconsäure mit *Aspergillus terreus* wird vorzugsweise durch Beimpfen mit Sporen gestartet (Willke and Vorlop 2001). Die Morphologie kann direkt im Bioreaktormaßstab untersucht werden und z.B. durch Einstellen einer bestimmten Sporenkonzentration gezielt angepasst werden (Papagianni and Moo-Young 2002). Bei Pilzstämmen, die keine Sporen bilden – dazu gehören auch die in dieser Arbeit untersuchten Pilze –, ist hingegen eine Kultivierung über mehrere Vorkulturen notwendig, um ausreichend Biomasse zu erzeugen. Treten in der Phase der Vorkultivierung Abweichungen auf, so ist die Reproduzierbarkeit des Produktionsprozesses gefährdet. Das Beimpfen mit Sporen im Reaktormaßstab unter Umgehung von Vorkultivierungsschritten bietet somit den Vorteil einer erhöhten Reproduzierbarkeit der Kultivierung.

Die Herausforderungen in der Kultivierung von filamentösen Pilzen bestehen darin,

- reproduzierbare Kultivierungsbedingungen einzustellen (Driouch et al. 2010; Hansen et al. 2015; Higashiyama et al. 1998; Posch et al. 2013)
- eine definierte Morphologie stabil einzustellen (Wiebe et al. 1996)
- hohe Stoffübergangskoeffizienten zu erreichen, ohne dass dadurch Scherkräfte auftreten, die eine Schädigung des Mycels verursachen (Cui et al. 1998; Gibbs et al. 2000; Nielsen 1996)

bzw.

Kultivierungsbedingungen einzustellen, die zu einer Morphologie führen, welche eine optimale Penetration mit Nährstoffen erlaubt (Hille et al. 2005)\*

\*Ziel zahlreicher Untersuchungen ist es somit, einen Kompromiss zu finden zwischen optimaler Morphologie und guter Durchmischung (Stoffübergang). So kann filamentöses Wachstum (als Mycel, keine Pellets) vorteilhaft für die Produktbildung sein, jedoch aufgrund der hohen Viskosität den Nachteil einer ungenügenden Durchmischung mit sich bringen. Abhängig vom kultivierten Pilzstamm kann jedoch trotzdem gute Durchmischung erzielt werden, wenn der Stamm aufgrund der Zellwandbeschaffenheit einer erhöhten mechanischen Belastung standhält (Göğüs et al. 2006; Wucherpfennig et al. 2010).

- die Morphologie durch Medienzusätze, die Organismus und Umwelt schonen sowie günstig und regenerierbar sind, zu beeinflussen und zu optimieren (Domingues et al. 2000; Etschmann et al. 2014; Papagianni and Moo-Young 2002; van Suijdam et al. 1980; Wucherpfennig et al. 2011).
- die Morphologie im Prozess für eine potenzielle Prozesssteuerung kontinuierlich zu überwachen (E. Y. Park et al. 2002a; Treskatis et al. 1997)\*

\*Bis heute existieren keine Methoden, die eine online-Analyse der Morphologie im laufenden Prozess ermöglichen. Eine neu entwickelte Methode zur schnellen Analyse mit großem Probenumfang liefert Posch et al. (2012), jedoch sind bei dem beschriebenen Verfahren Probenvorbereitungen notwendig. Dadurch treten ggf. Veränderungen an der Morphologie auf und die Methode ist nicht universell (auf unterschiedliche Pilzstämme) einsetzbar.

### 1.3.1 Kultivierung von *Schizophyllum commune*

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm von *S. commune* bildet keine Sporen, sodass mit vegetativem Mycel beimpft werden muss und die Kultivierungsführung bis zur Kultivierung im Reaktormaßstab mehrere Vorkultivierungsschritte einschließt. Dies ist mit den zu Anfang des Kapitel 1.3 erläuterten Nachteilen verbunden.

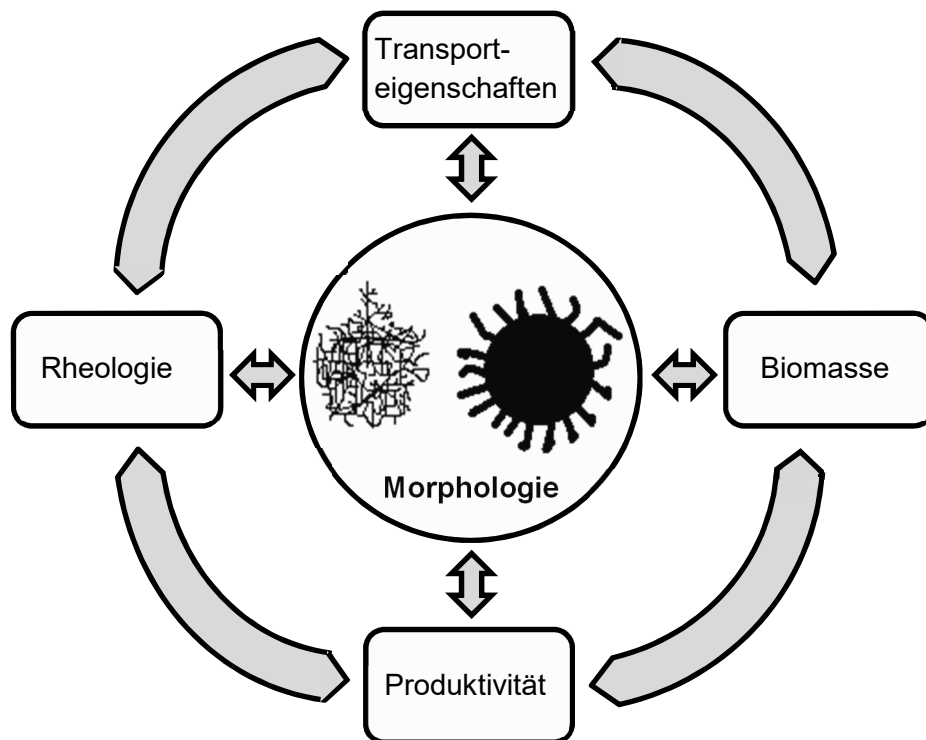
Die zur Glucanproduktion optimalen Kultivierungsbedingungen wurden in früheren Arbeiten bereits beschrieben (Rau et al. 1990; Rau et al. 1992). Die Optimierung umfasste die Zusammensetzung des Mediums (und des pH-Werts), die Temperatur

während der Kultivierung, die Schüttelfrequenz bzw. Drehzahl des Rührers, die Bauart des Rührers sowie die Begasungsrate (Gura and Rau 1993).

Die bisher höchste Raum-Zeit-Ausbeute wurde durch kontinuierliche Zerkleinerung des Mycels mit einer Zahnradpumpe in einer externen Schlaufe erzielt (bei *batch*-Kultivierung). Es wurde eine Raum-Zeit-Ausbeute von 3,1 g/(L·d) erreicht (Veuskens et al. 1990). Unter gleichen Kultivierungsbedingungen ohne Mycelzerkleinerung lag die Raum-Zeit-Ausbeute bei 2,8 g/(L·d) und der Ertragskoeffizient  $\frac{\text{gPolysaccharid}}{\text{gBiotrockenmasse}}$  verringerte sich. Scherbelastung und Sauerstoffversorgung wurden als die beiden Schlüsselfaktoren zur Optimierung der Polysaccharidbildung beschrieben (Gura and Rau 1993; Rau and Brandt 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufreinigung nicht untersucht. Alle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem bereits optimierten Medium durchgeführt und auch die Kultivierungsbedingungen wurden nicht verändert. Alle Angaben darüber befinden sich im Material- und Methodenteil.

Die nachfolgende Grafik zeigt schematisch die Beziehung zwischen Morphologie und weiteren Parametern, hauptsächlich Umgebungsbedingungen, für *S. commune*. Auch der Beziehung zwischen Rheologie und Produktivität kommt bei Kultivierung von *S. commune* eine entscheidende Rolle zu, da mit zunehmender Glucankonzentration die Viskosität der Kultivierungsbrühe ansteigt. Werden beispielsweise kompakte Pellets gebildet, so ist ein guter Massen- und Wärmetransport über den gesamten Reaktor möglich. Jedoch liegen innerhalb der Pellets schlecht versorgte Bereiche der Biomasse vor, welche (je nach Produkt) nicht zur Produktivität des Organismus beitragen. Bei mycelförmigem Wachstum hingegen entsteht eine viskose Kulturbrühe (nicht newtonsch), die insgesamt keine gute Versorgung der Biomasse zulässt bzw. es entstehen schlecht durchmischte Bereiche und beim Versuch, dies durch erhöhte Rührergeschwindigkeit zu umgehen, kann die Biomasse geschädigt werden.



**Abb. 1.3:** Beziehung zwischen Kultivierungsbedingungen bzw. Prozesseigenschaften, Morphologie und Produktivität.

Die Abhängigkeit zwischen Produktivität und Morphologie von *S. commune* wurde bisher nicht untersucht. Auch die Faktoren, mit denen Einfluss auf die Morphologie von *S. commune* genommen werden kann, sind unbekannt bzw. in der Literatur nicht beschrieben.

#### 1.4 Entwicklung der Morphologieanalyse

Die Analyse der Morphologie filamentöser Pilze kann in die Untersuchung mikro- und makromorphologischer Parameter unterteilt werden. Bei mikromorphologischen Untersuchungen werden zum Beispiel Länge der Hyphen und die Anzahl an Verzweigungen untersucht. Erste Untersuchungen hierzu wurden von Trinci (1974) vorgenommen. Er untersuchte den Verzweigungsgrad verschiedener filamentöser Pilze und zeigte, dass das Wachstum des Myzels aus der Verdopplung einer Wachstumseinheit (Quotient aus Hyphengesamtlänge und Gesamtanzahl der Hyphenspitzen) beruht. Eine Methode zur quantitativen Beschreibung der Pilzmorphologie wurde 1981 als erstes von Metz et al. entwickelt. Sie untersuchten mikromorphologische Parameter von *Penicillium chrysogenum*. Zwar wurden Fotos mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera aufgenommen, jedoch mussten

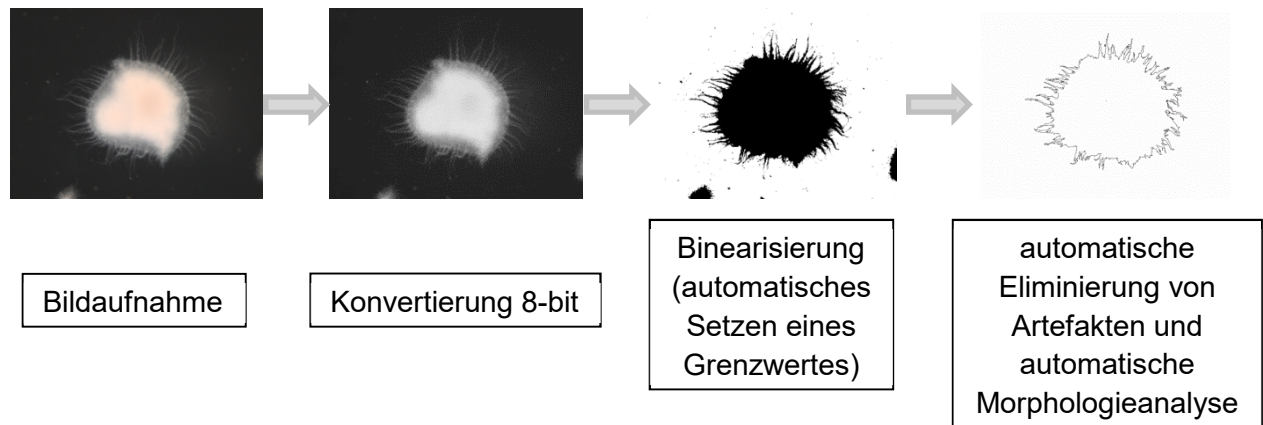
die Fotos manuell auf ein Grafiktablett (Digitizer) übertragen werden und für ein von Metz et al. geschriebenes Programm mussten Punkte auf einer Hyphe auf dem Grafiktablett manuell markiert werden, um den Abstand bzw. die Länge von Hyphen durch das Programm berechnen zu können. Die entwickelte Methode war somit nur halbautomatisch, daher aufwendig und nicht sehr genau.

Packer und Thomas entwickelten 1990 das erste Verfahren zur vollautomatischen Bildanalyse für morphologische Vermessungen von filamentösen Mikroorganismen. Dabei kam ihnen der Fortschritt der modernen Computertechnologie zugute. Diese ermöglichte es ihnen, einen digitalen und kommerziell erhältlichen Bildanalysator (Magiscan 2A) für ihre Anwendung einzusetzen (Adams and Thomas 1988). Die automatische Bildanalyse wurde wenig später erstmals auch zur Bestimmung makromorphologischer Parameter bzw. der Pelletmorphologie eingesetzt (Cox and Thomas 1992). Um den Kontrast zu erhöhen, mussten die Pellets jedoch manuell angefärbt werden. Cox und Thomas (1992) untersuchten die projizierte Pelletfläche, die Zirkularität, die Rauheit der Pellets und weitere makromorphologische Parameter eines *A. niger* Stammes im Kultivierungsverlauf. Sie untersuchten erstmals Zusammenhänge zwischen vorliegender Biomasse und automatisch analysierten, morphologischen Parametern der Pellets. Für die automatische Analyse des Pelletdurchmessers ermittelten sie beispielsweise, dass sich der zeitliche Aufwand im Vergleich zur manuellen Bestimmung um das 15-Fache reduzierte.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bezogen sich ausschließlich auf die Makromorphologie. Nachfolgend werden daher ausschließlich in der Literatur beschriebene Untersuchungsmethoden zur Analyse der Makromorphologie zusammengefasst. Aufgrund der beschriebenen Fortschritte in der Bildanalyse wurden etwa seit Beginn der 2000er Jahre zahlreiche quantitative Untersuchungen vorgenommen (Barry and Williams 2011; Bizukoje and Ledakowicz 2010; Coban et al. 2015; Driouch et al. 2010; Driouch et al. 2011; Fang et al. 2002; Kaup et al. 2008; Kelly et al. 2006; Papagianni and Moo-Young 2002; Papagianni and Matthey 2006; J. P. Park et al. 2002b, 2002c; Paul and Thomas 1998; Schügerl et al. 1998; Sinha et al. 2001b; Sinha et al. 2001a; Wagner et al. 2004; Wucherpfennig et al. 2011; Wucherpfennig et al. 2012; Žnidaršič et al. 2000).

Die makromorphologische Analyse von Pellets des größten Teils dieser Untersuchungen geht auf die von Cox und Thomas (1992) beschriebene Bildanalyse

zurück. Die Schritte der Bildverarbeitung, wie sie auch in dieser Arbeit angewendet wurden, sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4:** Schritte der Bildverarbeitung zur Analyse der Morphologie filamentöser Pilze am Beispiel eines Pellets von *S. commune*.

Eine Automatisierung der Pelletmikroskopie wurde bisher nur in wenigen Veröffentlichungen beschrieben. Von Treskatis et al. (1997) wurde eine At-Line-Methode entwickelt, bei der Probenahme und Verdünnung automatisch erfolgten und die Suspension anschließend durch eine selbst gebaute Durchflussskivette gepumpt wurde. Mit den morphologischen Parametern, die aus der automatischen Bildauswertung zugänglich wurden und der Pelletkonzentration konnten sie den vorliegenden Biomassegehalt eines *Streptomyces* Stamms zeitnah berechnen.

Andere Untersuchungen, die ebenfalls in einer Durchflussskivette vorgenommen wurden, zielten hingegen auf die Untersuchung der Sporenauskeimung und des anschließenden Wachstums ab (Spohr et al. 1998). Da die Sporen dazu in der Durchflussskivette fixiert wurden, handelte es sich dabei zwar um ein Online-System, jedoch ließen sich damit keine realen Kultivierungsbedingungen wie im Bioreaktor abbilden. Dieses System wurde für sporulierende Pilzstämme vereinzelt weiterhin verwendet (E. Y. Park et al. 2002a).

Die Parameter zur Beschreibung der Morphologie filamentöser Pilze werden um Größen ergänzt, die aus einer fraktalen Analyse der Pilzmorphologie hervorgehen. Die fraktale Analyse wurde von Mandelbrot (1983) genutzt, um sich selbst ähnelnde Strukturen bei verschiedenen Vergrößerungen zu beschreiben. Sie kann verwendet werden, um auch bei Pilzmycelien oder Pellets derartige Strukturen zu identifizieren (Papagianni 2006). Die Parameter, welche von der Fraktalanalyse geliefert werden, bilden sehr ähnliche Eigenschaften der Morphologie ab, wie andere morphologische

Parameter. In erster Linie beschreiben sie die Irregularität der Oberfläche und dienen der Unterscheidung grundlegend unterschiedlicher Wuchsformen, also z.B. der Unterscheidung zwischen pelletförmigem oder mycelartigem Wachstum (Papagianni 2006). Da entsprechende morphologische Eigenschaften in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle spielen, wurden keine fraktalen Untersuchungen durchgeführt. Eine aktuelle Zusammenfassung zur fraktalen Analyse auf dem Gebiet der Mikroskopie ist bei Landini et al. (2011) beschrieben.

## 1.5 Beeinflussung der Morphologie filamentöser Pilze

Die Morphologie wird durch Faktoren chemischer (z.B. die Konzentration von Medienbestandteilen) oder physikalischer Art (z.B. den Scherstress oder die Temperatur) beeinflusst (Kossen 2000) (Tab. 1.1). Darüber hinaus hängt die Morphologie vom Stamm selbst, also von genetischen Faktoren ab. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden auf die chemischen und physikalischen Einflüsse begrenzt.

**Tab. 1.1:** Allgemein Morphologie-beeinflussende Faktoren bei filamentösen Pilzen

chemisch	physikalisch	biologisch
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konzentration von Medienbestandteilen (z.B. Konzentration der C- oder N-Quelle)</li> <li>• pH Wert</li> <li>• Medienbestandteile: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Spurenelemente</li> <li>- Mikropartikel</li> <li>- Polymere</li> <li>- Oberflächenaktive Substanzen</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Energieeintrag <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schüttelfrequenz</li> <li>- Begasungsrate*</li> </ul> </li> <li>• Osmolalität*</li> <li>• Temperatur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inokulumkonzentration</li> <li>• Genom (Proteom)</li> </ul>

\* Einfluss kann zudem auch chemisch sein



Die Morphologie wurde für den Pilz der Gattung *Schizophyllum* bisher noch nicht quantitativ untersucht. Wie die in Tabelle 1.1 aufgelisteten Einflussfaktoren die Morphologie von *S. commune* beeinflussen können, ist daher nicht bekannt.

## **1.6 Statistische Versuchsplanung und multivariate Datenanalyse**

Die statistische Versuchsplanung ist ein Verfahren, mit dem der Zusammenhang mehrerer Faktoren auf eine Zielgröße bestimmt wird. Ronald Aylmer Fisher beschrieb 1935 anhand von Feldversuchen in der Landwirtschaft als Erster umfassend die Grundlagen der statistischen Planung und Auswertung von Versuchen (Fisher 1935). Eine bedeutende Erweiterung der statistischen Versuchsplanung wurde von Box und Wilson (1951) vorgenommen. Sie entwickelten Versuchspläne, mit denen auch quadratische Abhängigkeiten zwischen den Einflussfaktoren und der Zielgröße berechenbar wurden, sodass Maxima und Minima aufgedeckt werden können.

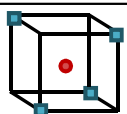
Die statistische Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) kann gleichermaßen für Screeningversuche oder Optimierungen eingesetzt werden. Im Gegensatz zum *One-factor-at-a-time* Ansatz werden bei Anwendung des DoE mehrere Parameter gleichzeitig verändert, sodass auch Interaktionseffekte zwischen verschiedenen Parametern untersucht werden können. Posch et al. (2013) bemerkten, dass DoE bisher noch nicht zur Beschreibung der Morphologie von filamentösen Pilzen zur Anwendung kam.

In dieser Arbeit wurden Versuchspläne nach den Regeln des DoE entworfen und durchgeführt sowie jeweils einer umfassenden statistischen Auswertung unterzogen, um die Morphologie von *S. commune* und von *S. rolfsii* in Abhängigkeit verschiedener Parameter mit Hilfe dieser Methodik zu beschreiben. Im Screening werden zunächst möglichst viele Parameter untersucht, welche eine beliebige Zielgröße potentiell beeinflussen können. Dazu werden bestimmte Screeningversuchspläne verwendet, die eine deutliche Reduzierung des Aufwands ermöglichen. So wird zum Beispiel mit Hilfe eines Plackett-Burman-Versuchsplans die Abschätzung der Effekte von bis zu 19 Faktoren mit nur 20 Versuchen möglich (Plackett and Burman 1946). Haltrich et al. (1994) untersuchten z.B. mit einem Plackett-Burman-Versuchsplan den Einfluss von sieben verschiedenen Medienbestandteilen auf die Xylanaseproduktion von *S. rolfsii* in nur zwölf Experimenten.

Mit zwölf zum Plackett-Burman-Plan zusätzlichen Experimenten, bei denen anstatt der hohen die niedrige Konzentration des Medienbestandteils eingesetzt wird und umgekehrt, können auch Interaktionseffekte von jeweils zwei Medienbestandteilen untersucht werden. Anschließend erstellten Haltrich et al. (1994) auf Grundlage der als signifikant identifizierten Parameter einen Versuchsplan zur Optimierung. Dieser lieferte als Ergebnis die Konzentration der Medienbestandteile für eine maximale Xylanaseproduktion.

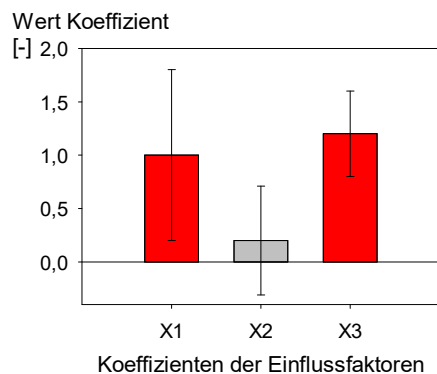
Die statistische Versuchsplanung wurde bislang nicht verwendet, um die Abhängigkeit morphologischer Zielgrößen von Prozessparametern zu beschreiben. Auf die Notwendigkeit, die statistische Versuchsplanung als systematischen Untersuchungsansatz einzusetzen, wird in der Literatur jedoch ausdrücklich hingewiesen (Posch et al. 2013). Nachfolgend wird ausführlich erläutert, wie entsprechende Versuchspläne aufgebaut sind und wie sie in der Biotechnologie eingesetzt werden.

**Schritt 1: Versuchsplan aufstellen (Kodierung potenzieller Einflussfaktoren)**

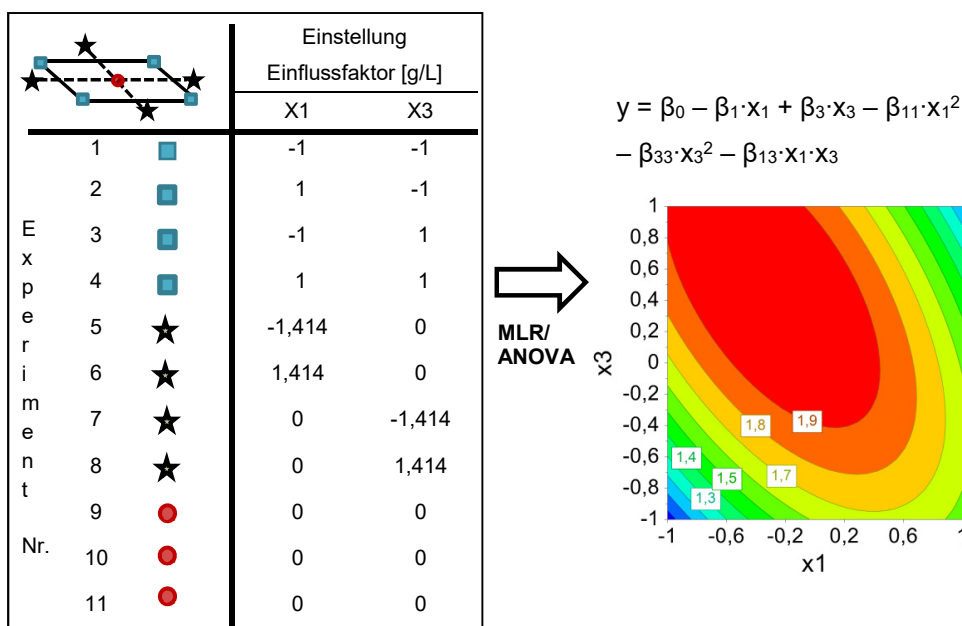
Einflussfaktor	Kodierung: Konzentration [g/L]			Einstellung Einflussfaktor [g/L]		
	-	+		X1	X2	X3
X1	1	2		-1	-1	1
X2	0,02	0,04		1	-1	-1
X3	4	8		-1	1	-1
				1	1	1
				0	0	0
Nr.						

**Schritt 2: Versuche in zufälliger Reihenfolge durchführen, Zielgröße y messen**

**Schritt 3: Einflussfaktoren und Zielgröße mittels MLR korrelieren. Signifikante Faktoren mittels ANOVA ermitteln.**



**Schritt 4: Optimierungsversuchsplan aufstellen, weiter wie in Schritt 2 und 3.**



**Abb.1.5:** Schrittweise Vorgehensweise bei der statistischen Versuchsplanung. Im ersten Schritt werden potenzielle Einflussfaktoren auf zwei Stufen festgelegt. Die Einstellungen der Einflussfaktoren werden im gezeigten Beispiel in einem teilfaktoriellen Versuchsplan kombiniert.

Anschließend werden die Versuche bei den gewählten Einstellungen in zufälliger Reihenfolge durchgeführt (Schritt 2). Im nächsten Schritt wird die Zielgröße mittels multipler linearer Regression (MLR) mit den Faktoren korreliert und die signifikanten Faktoren mittels *analysis of variance* (ANOVA) ermittelt (im Beispiel Faktor X1 und X3). Für die signifikanten Faktoren wird ein weiterer Versuchsplan mit zusätzlichen Stufen entworfen und durchgeführt. Die Korrelation ergibt ein Polynom mit den bekannten Koeffizienten  $\beta$ . Das Optimum im untersuchten Bereich kann in einer Abbildung (*response surface plot*) dargestellt werden.

In Abbildung 1.5 ist das schrittweise Vorgehen bei der statistischen Versuchsplanung vom Screening bis zum Ergebnis der Optimierung skizziert. Zunächst werden Screening-Versuchspläne erstellt, die lineare Abhängigkeiten beschreiben (Gl. 1).

$$Y_i(\beta, x_j) = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j \cdot x_{j,i} + \varepsilon_i \quad (\text{Gl. 1})$$

mit  $\beta_j$  = Regressionskoeffizient zu Einflussfaktor  $x_j$  bei Experiment  $i$

$y_i$  = Zielgröße bei Experiment  $i$

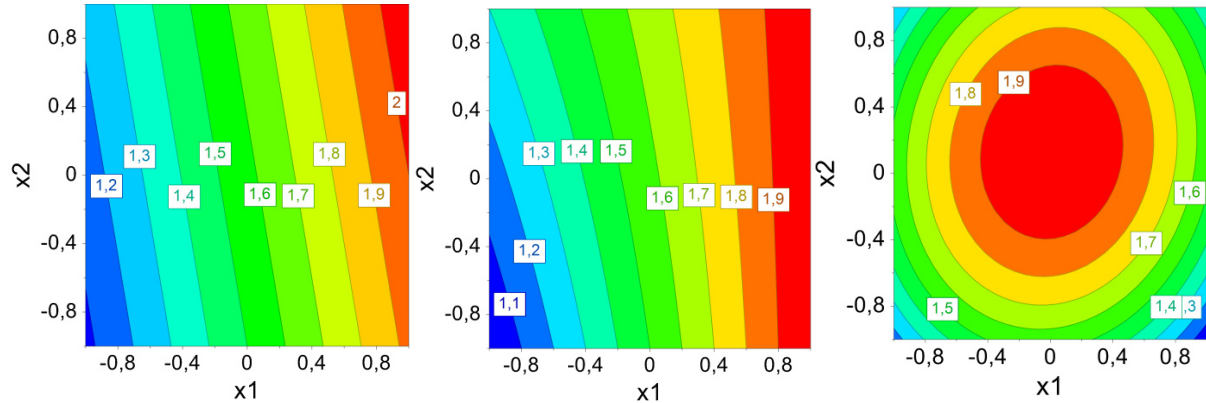
$x_{j,i}$  = Einflussfaktor  $j$  bei Experiment  $i$

$\varepsilon_i$  = Fehler bei Experiment  $i$

Dabei werden möglichst wenige Faktoreinstellungen und -kombinationen untersucht, um den Versuchsumfang gering zu halten. Im Beispiel in Abbildung 1.5 ist ein teilfaktorieller Versuchsplan gezeigt. Im erweiterten Sinn zählen auch vollfaktorielle Versuchspläne zu den Screening-Plänen, mit denen auch der Einfluss von Interaktionen zwischen den Parametern auf die Zielgröße beschrieben werden kann. Nach Durchführung der Versuche in zufällig festgelegter Reihenfolge wird die gemessene Zielgröße  $y$  mit den Einflussfaktoren mit Hilfe der multiplen linearen Regression korreliert. Die signifikanten Faktoren werden durch eine Varianzanalyse (*analysis of variance* (ANOVA)) ermittelt. Ist der in Abbildung 1.5 gezeigte halbe Fehlerbalken größer als der Wert des Koeffizienten für einen Einflussfaktor, so ist der entsprechende Faktor nicht signifikant. Im gezeigten Beispiel sind also nur die Faktoren  $X_1$  und  $X_3$  signifikant. Der Einfluss der signifikanten Faktoren auf die Zielgröße kann in einem Optimierungsversuchsplan genauer untersucht werden. Im Beispiel in Abbildung 5 ist ein CCC-Versuchsplan (*central composite circumscribed*) gezeigt. Dieser besteht aus einem vollfaktoriellen Versuchsplan mit Zentrumsversuchen, welche durch die Ecken und den Flächenschwerpunkt eines Quadrats repräsentiert werden. Zur Berechnung quadratischer Abhängigkeiten, werden die als Sternpunkte gekennzeichneten Faktoreinstellungen außerhalb des Quadrats in den Versuchsplan integriert. Wie beim Screening werden nach Versuchsdurchführung in zufälliger Reihenfolge die Faktoren mit der Zielgröße mittels MLR korreliert und die signifikanten Faktoren mit der Varianzanalyse bestimmt.

Der Zusammenhang zwischen Einflussfaktor und Zielgröße wird mit Polynomen zweiter Ordnung beschrieben (Gl. 2).

$$Y_i(\beta, x_j) = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j \cdot x_{j,i} + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{k>j}^k \beta_{j,k} \cdot x_{j,i} \cdot x_{k,i} + \sum_{j=1}^k \beta_{j,j} \cdot x_{j,i}^2 + \varepsilon_i \quad (\text{Gl. 2})$$

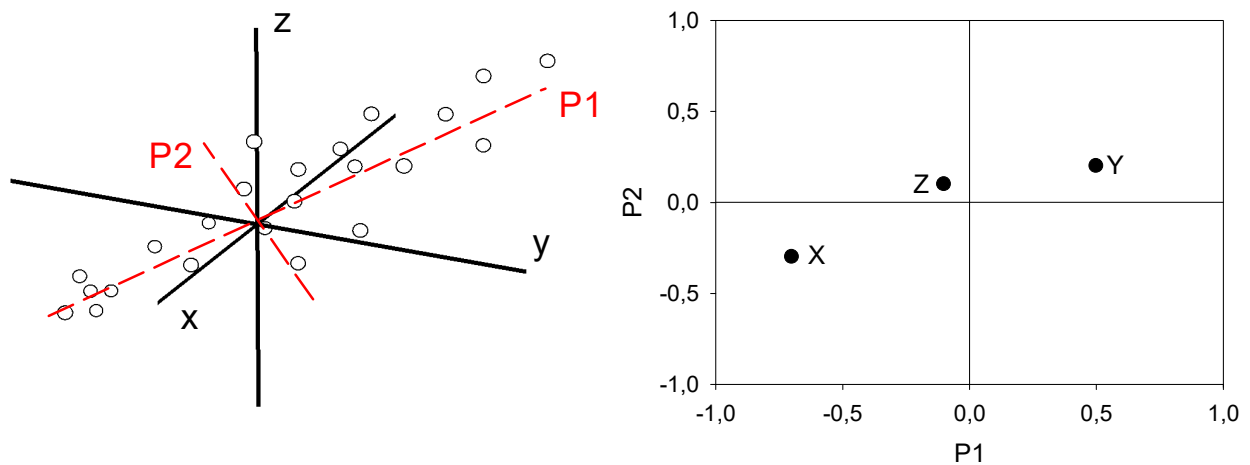


**Abb. 1.6:** Zielgröße (farbliche Darstellung) in Abhängigkeit von zwei Einflussfaktoren basierend auf einem Screening-Versuchsplan (nur lineare Abhängigkeiten), einem vollfaktoriellen Versuchsplan sowie einem Optimierungsplan.

Die einzelnen Schritte der statistischen Versuchsplanung sind z.B. bezüglich Medienoptimierung bei Haltrich et al. (1994) für die Kultivierung von *S. rolfsii* ausführlich beschrieben. Bei Kumari et al. (2008) wurde die Medienoptimierung mittels DoE auch für einen Stamm von *S. commune* beschrieben. Daneben gibt es weitere Untersuchungen, in denen die statistische Versuchsplanung zum Screening und zur Optimierung von Fermentationsmedien genutzt wurde (Burkert et al. 2004; Muralidhar et al. 2001; Rajendran et al. 2007). Weuster-Botz (2000) gibt eine Übersicht über die Methodik und Möglichkeiten der statistischen Versuchsplanung bei der Fermentationsmedien-optimierung. Um den Einfluss von Medienbestandteilen auf die Morphologie filamentöser Pilze zu untersuchen, wurde die statistische Versuchsplanung bisher nicht verwendet. Die Morphologie blieb bei allen bisher durchgeführten Untersuchungen unberücksichtigt.

Um die Beziehung zwischen vielen Parametern (z.B. verschiedenen Messwerten wie Temperatur, Druck, Glucosekonzentration, etc.) zu untersuchen, kann die Hauptkomponentenanalyse (*principal components*) verwendet werden. Diese geht auf Pearson (1901) zurück. Bei der Hauptkomponentenanalyse wird die Dimensionalität reduziert, d.h. ein neues Koordinatensystem, das einen möglichst großen Teil der Gesamtvarianz enthält, beschreibt den Datensatz. Die „Achsen“ dieses Koordinatensystems stellen Vektoren dar, die als Hauptkomponenten bezeichnet

werden. Oft reichen schon zwei Hauptkomponenten aus, um den Datensatz zu beschreiben (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung von zwei Hauptkomponenten (P1 und P2), welche die Varianz einer zentrierten Punktwolke im dreidimensionalen Raum approximieren (links); die Dimensionalität der Hauptkomponentenanalyse ist nicht begrenzt (k-dimensional). Die Hauptkomponente P1 geht durch den Mittelpunkt der Punktwolke und beschreibt die größtmögliche Varianz des x,y,z-Datensatzes. Hauptkomponente P2 verläuft orthogonal zu Hauptkomponente P1 durch den Mittelpunkt und beschreibt einen weiteren möglichst großen Anteil der Varianz des dreidimensionalen Datensatzes. P1 und P2 spannen eine Fläche im dreidimensionalen Raum auf. Der Einfluss der Variablen wird durch den *Loading Plot* (rechts) beschrieben.

*Loadings* beschreiben die Orientierung der Modellebene im k-dimensionalen Raum. Die Richtung von Hauptkomponente P1 in Bezug zu den originären Variablen wird durch den Cosinus des Winkels  $\alpha_x$ ,  $\alpha_y$  und  $\alpha_z$  zwischen der Hauptkomponente und der jeweiligen Achse x, y und z errechnet. Aus dem *Loading Plot* wird ersichtlich, zu welcher Hauptkomponente die Variablen beitragen (siehe Abbildung 1.7 rechts). Der *Loading Plot* zeigt zudem an, wie groß der Einfluss einer Variablen ist. Je weiter die Variable vom Ursprung entfernt ist, umso größer ihr Einfluss, da sie einen umso größeren Anteil der durch das Modell beschriebenen Varianz enthält. Variablen in diagonal gegenüber liegenden Quadranten (im vorliegenden Beispiel die Variablen x und y) korrelieren negativ miteinander. Variablen, die dicht zusammen liegen, korrelieren positiv miteinander. In dem dargestellten Beispiel hat die Variable z kaum einen Einfluss.

Aus der Hauptkomponentenanalyse geht demnach hervor, welche Parameter sich gleich verhalten oder ob sich Parameter entgegengesetzt verhalten. So zeigten Gurden et al. (1998) mit einer Hauptkomponentenanalyse für Prozessvariablen (in diesem Fall Sensorsignale) einer Pilotanlage, dass bestimmte Sensorsignale mit den

übrigen Sensorsignalen negativ korrelierten. Durch weitere Untersuchungen wurde herausgefunden, dass Probleme mit den Sensoren zu der Abweichung führten und die entsprechenden Variablen daher nicht einbezogen werden sollten. Darüber hinaus gab der *Loading Plot* darüber Aufschluss, welche Variablen sehr dicht beieinander lagen und daher sehr ähnliche Informationen lieferten. Somit kann z.B., um Kosten einzusparen, auf zugehörige Messungen verzichtet werden.

Wenige Beispiele finden sich in der Literatur zu Pilzmorphologien, welche in Hauptkomponentenanalysen eingingen. Beispielsweise wurde der Einfluss der Morphologie von *Streptomyces fradiae* auf NIR-Messungen (near-infrared) zur Bestimmung der Biomassekonzentration mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse untersucht. Mittels der Hauptkomponentenanalyse konnte gezeigt werden, dass ein Einfluss zwischen der spektralen Information der getrockneten Biomasse und den verschiedenen morphologischen Ausprägungen von *S. fradiae* bestand (Vaidyanathan et al. 2003). Auch Zusammenhänge zwischen Morphologie und Enzymproduktivität wurden bereits aufgedeckt (Ahamed and Vermette 2009). Darüber hinaus wurden Zusammenhänge der Morphologie mit Zielgrößen der Kultivierung mittels Hauptkomponentenanalyse in der Literatur bisher kaum untersucht.

## 1.7 Zielsetzungen

Die Kultivierungsführung ausgehend von einer mit Pilzmycel bewachsenen Agarplatte über mehrere Kultivierungsschritte bis in den Reaktormaßstab reproduzierbar zu gestalten, war grundlegendes Ziel dieser Arbeit. Morphologiebeeinflussende Prozessparameter sollen dabei nach Möglichkeit so ausgelegt werden, dass die Morphologie bei Veränderung der Parameter möglichst wenig variiert. Dabei soll gleichzeitig berücksichtigt werden, dass hohe Produktausbeuten möglich bleiben. Die Reproduzierbarkeit soll zudem anhand morphologischer Parameter kontrolliert werden.

Auf Grundlage der reproduzierbaren Kultivierungsführung sollen Struktur-Eigenschafts-Beziehungen hergestellt werden. Damit sollen hohe bzw. geringe Produktivitäten bestimmten morphologischen Ausprägungen zugeordnet werden.

Eine Automatisierung der Mikroskopie (*proof of concept*) soll vorgenommen werden, um die Analyse möglichst schnell durchführen zu können und größere Stichprobenumfänge zu ermöglichen. Auch die Analyse der Bildauswertung zur Ermittlung der morphologischen Parameter soll automatisiert werden.

Die statistische Versuchsplanung (DoE) soll eingesetzt werden, um die Morphologie in Abhängigkeit verschiedener Parameter zu beschreiben, da bisher in der Literatur keine Anwendung des DoE für filamentöse Pilze beschrieben wurde.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stammhaltung von *Schizophyllum commune* und *Sclerotium rolfsii*

Die Stammhaltung von *Schizophyllum commune* DSM 6320 und *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 erfolgte auf Agar aus Komplexmedium (Tab. 2.1). Es wurden Petrischalen mit Belüftungsnocken verwendet (94x15 mm, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich).

**Tab. 2.1:** Medienbestandteile von Agar zur Anzucht von *S. commune* und *S. rolfsii*

Medienbestandteil (Hersteller)	Konzentration [g/L]
Technischer Hefeextrakt (Ohly, Hamburg, Germany)	5
Potato Dextrose Agar, Marke Difco (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)	39
Agar Agar, Marke Bacto (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA)	8

Die Agarplatten wurden mit einem kreisrunden Stück Agar (1 cm Durchmesser), das aus einer bewachsenen Agarplatte mit 0,5 cm Abstand zum Rand der mit Mycel bewachsenen Platte ausgestanzt wurde, beimpft. Zum Wachstum der Pilze wurden die Platten für 6 bzw. 3 Tage bei 25 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Platten – ebenfalls unter Lichtausschluss – mit der Oberseite nach unten und mit Parafilm verschlossen, bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Lagerung bei 4 °C erfolgte bis zur weiteren Verwendung der Platten in der Regel für etwa 20 h. Zum Teil erfolgte auch eine deutlich längere Lagerung. Sie betrug jedoch nie mehr als vier Wochen bis zur weiteren Verwendung der Platten, um mit dem gewachsenen Mycel z.B. Flüssigkulturen oder weitere Platten für die Stammhaltung zu beimpfen.

## 2.2 Kultivierung in Flüssigkultur

Die Kultivierung erfolgte in monoseptischer Submerskultur. Im Schüttelkolbenmaßstab wurde die Kultivierung von *S. commune* und *S. rolfsii* in Schikanekolben eines Volumens von 500 oder 1000 mL (DURAN, Wertheim, Germany) durchgeführt. Die Kultivierung in erster Vorkultur erfolgte immer in 500 mL-Kolben. Alle Kultivierungen in erster Vorkultur wurden ausgehend von einer mit Pilzmycel bewachsenen Agarplatte beimpft. Für die Kultivierung in zweiter Vorkultur wurden ausschließlich Kolben mit 1000 mL Fassungsvermögen eingesetzt. Das Arbeitsvolumen betrug jeweils 20 % des Kolbenvolumens. Alle Kultivierungen wurden bei 27 °C und einer Schüttelfrequenz von 100 min<sup>-1</sup> (Upm) (Auslenkung des Tablars: 25 mm) in einem Schüttelinkubator von Infors (Bottmingen, Switzerland) vorgenommen. Die Kultivierungen wurden nach 72 h abgebrochen bzw. es wurde anschließend überimpft. Bei abweichender Kultivierungsdauer ist dies vermerkt. Kultursuspension zum Überimpfen wurde durch Ausschütten aus dem Kolben entnommen. Probenahmen wurden mit Pilzpipettenspitzen durchgeführt.

Kultivierungen im Bioreaktor wurden entweder im Maßstab von 3 oder 30 Litern Arbeitsvolumen vorgenommen.

Bei Kultivierung im 3 L Maßstab kamen Minifors-Reaktoren der Infors AG zum Einsatz. Für das Rührsystem wurde eine Kombination aus einem Scheibenrührer (d = 5,4 cm) und einem dreigliedrigen Elefantenohrrührer (d = 8,5 cm) verwendet. Der Scheibenrührer wurde 12 mm, der Elefantenohrrührer 89 mm über dem unteren Ende der Rührwelle montiert. Die Begasung mit Luft erfolgte über ein U-förmiges Begasungsrohr mit einer volumenspezifischen Begasungsrate von 0,08 V/VM. Es wurde mit einer Rührerdrehzahl von 300 min<sup>-1</sup> durchmischt.

Bei Kultivierung im 30 L Maßstab wurde der Reaktor B44201/1 (B. Braun + Diessel Biotech GmbH, Melsungen, Germany) verwendet. Die Steuerung erfolgte mit dem System Biostat P, ebenfalls der B. Braun + Diessel Biotech GmbH. Es wurden drei viergliedrige Schrägblattrührer mit einem Anstellwinkel der Schaufeln von 45° verwendet. Der Abstand zwischen den einzelnen Schrägblattrührern betrug 120 mm. Das Durchmesser Verhältnis (Rührer zu Reaktor) betrug 0,64. Zusätzlich wurde der Reaktor mit vier Strombrechern ausgestattet. Die Drehzahl des Rührers lag bei 90 min<sup>-1</sup> und es wurde eine volumenspezifische Begasungsrate von 0,08 V/VM eingestellt. Die Luftbegasung erfolgte über eine Ringbrause kurz über dem Boden des

Reaktors. Wie in den Schüttelkolben erfolgten auch die Kultivierungen in den Bioreaktoren bei 27 °C.

Während der Kultivierung in den Bioreaktoren wurden zudem der pO<sub>2</sub> und die optische Dichte (OD) überprüft. Die pO<sub>2</sub>-Messung wurde mit dem Sensor VisiFerm DO 225 von Hamilton (Bonaduz, Switzerland) durchgeführt. Die OD-Messung bei einer Wellenlänge von 880 nm und die Aufzeichnung erfolgten mit Hilfe des Systems evo<sup>200</sup> von Fogale nanotech (Nîmes, France). Die Länge des optischen Sensorweges betrug 5 mm.

Für die Kultivierung beider Pilzstämme wurde komplexes Medium verwendet (Tab. 2.2 und 2.3).

**Tab. 2.2:** Medienzusammensetzung zur Anzucht von *Schizophyllum commune* in Submerskultur (Standardkomplexmedium).

Medienbestandteil (Hersteller)	Konzentration [g/L]
<b>A Standardkomplexmedium</b>	
Technischer Hefeextrakt (Ohly, Hamburg, Germany)	3
Glucose · H <sub>2</sub> O (Roth, Karlsruhe, Germany)	33
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth, Karlsruhe, Germany)	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Fluka, Buchs, Switzerland)	0,5

**Tab. 2.3:** Medienzusammensetzung zur Anzucht von *Sclerotium rolfsii* in Submerskultur (Standardkomplexmedium).

Medienbestandteil (Hersteller)	Konzentration [g/L]
<b>A Standardkomplexmedium</b>	
Technischer Hefeextrakt (Ohly, Hamburg, Germany)	1
Glucose · H <sub>2</sub> O (Roth, Karlsruhe, Germany)	33
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth, Karlsruhe, Germany)	1
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (Fluka, Buchs, Switzerland)	0,5
NaNO <sub>3</sub> · H <sub>2</sub> O (AppliChem, Darmstadt, Germany)	1,0
Zitronensäure · H <sub>2</sub> O (Riedel-de-Häen, Seelze, Germany)	0,7
KCl (Roth, Karlsruhe, Germany)	0,5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Merck, Darmstadt, Germany)	0,05

Glucose-Monohydrat wurde getrennt von den weiteren Medienbestandteilen autoklaviert. Dazu wurde eine Stammlösung einer Konzentration von 330 g/L hergestellt und autoklaviert. Die Konzentration von 30 g/L Glucose wurde nach dem Autoklavieren durch entsprechende Verdünnung eingestellt.

Für alle Medien wurde Milli-Q Wasser verwendet. Der pH-Wert wurde überprüft und ggf. mit 1M NaOH oder 1M HCl im Standardkomplexmedium für *S. commune* auf 5,30 (± 0,05) eingestellt. Das Medium für *S. rolfsii* wurde auf einen pH-Wert von 3,50 (± 0,05) gebracht. Die Medien wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert und direkt vor Gebrauch auf Raum-Temperatur erwärmt.

## 2.2.1 Medienzusätze

Wurden die in Tabelle 2.4 zusätzlich aufgeführten Medienbestandteile eingesetzt oder die Konzentrationen der Medienbestandteile variiert, so ist dies an entsprechender Stelle vermerkt.

**Tab. 2.4:** Medienzusätze zur Kultivierung von *S. commune*, die dem Standardkomplexmedium ggf. in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt wurden. Angaben zur Partikelgröße sind Herstellerangaben oder wurden mittels Laserbeugungsspektrometrie selbst gemessen. Beispiel für die Angabe eines Partikeldurchmessers:  $X_{10} = 4,9 \mu\text{m}$  bedeutet, dass der Durchmesser von 10 % der Partikel kleiner ist als  $4,9 \mu\text{m}$ .

Medienbestandteil (Hersteller)	Konzentration [g/L]	Partikeldurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]
Aluminiumoxid (H.B. Isoliertechnik, Landau, Germany)	2 / 8 / 14	$x_{10} = 4,9$ ; $x_{50} = 7$ ; $x_{100} = 26$
Bentonit (Roth, Karlsruhe, Germany)	2 / 8 / 14	Siebrückstand $63 \mu\text{m}$ : 10 – 30 %
Dolomit (Dolomitwerk Jettenberg Schöndorfer, Schneizelreuth, Germany)	2 / 8 / 14	$x_{50} = 6,8$ ; $x_{97} = 18,2$
Glasbeads (Kisker Biotech, Steinheim, Germany)	2 / 8 / 14	10 – 50
Siliciumdioxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	2 / 8 / 14	0,5 – 10 (80 % zwischen 1 und 5)
Talk ( $10 \mu\text{m}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	2 / 8 / 14 / 20 / 30	10 (Hersteller), $x_{50} = 6,03$ (eigene Messung mittels Laserbeugung)
Talk ( $44 \mu\text{m}$ ) (Fluka, Buchs, Switzerland)	14	44 (Hersteller), $x_{50} = 15,01$ (eigene Messung mittels Laserbeugung)
Talk ( $4 \mu\text{m}$ ) (Fraktion von Talk ( $10 \mu\text{m}$ ))	14	$x_{50} = 3,65$ (eigene Messung mittels Laserbeugung)
Titandioxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	2 / 8 / 14	max. 44
Titan Silicium Oxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	2 / 14	< 50 nm

Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Mikropartikel wurden trocken autoklaviert und vor Zugabe des Inokulums durch Schwenken gleichmäßig im Medium verteilt. Wurden

Mikropartikel in Kultivierungen des *S. rolfsii* Stamms getestet, so wurden die Partikel in einer Konzentration von 10 g/L eingesetzt.

Talkmikropartikel mit einer Partikelgröße von 3,65 µm wurden durch Abtrennung des Grobanteils kommerziell erhältlicher Talkpartikel ( $x_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ , Tab. 2.4) hergestellt. Dazu wurden jeweils 5 g Talkpartikel in ein 50 mL Falcongefäß gegeben und mit je 45 mL Milli-Q H<sub>2</sub>O versetzt. Die Partikel wurden im Wasser suspendiert und die großen Partikel wurden durch Zentrifugation bei 500g in 33 Sekunden (25 °C) abgetrennt. Direkt vor dem Zentrifugieren wurden bereits sedimentierte Partikel durch kurzes Aufschütteln noch einmal resuspendiert. Vom Überstand wurden direkt im Anschluss jeweils 20 mL Suspension entnommen und in ein weiteres Falcongefäß überführt. Der Überstand mit dem Feinanteil wurde ebenfalls zentrifugiert (1.000g, 5 min, 25 °C). Das Volumen des klaren Überstands wurde soweit reduziert, dass nach Resuspension der Partikel im verbleibenden Volumen eine Partikelkonzentration von 28 g/L vorlag. Diese Suspension wurde autoklaviert und nach anschließender Mischung im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem Standardkomplexmedium (Tab. 2.2) für die Kultivierung eingesetzt. Die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung mittels Laserbeugung sind im Anhang in Abb. A.1 dargestellt.

#### **2.2.1.1 Größenbestimmung von Talkmikropartikeln mittels Laserbeugung**

Zur Bestimmung der Partikeldurchmesser wurden die Partikel genauso behandelt, wie sie auch für die Kultivierungen eingesetzt wurden. Sie wurden zunächst trocken autoklaviert und anschließend im Medium suspendiert. Direkt vor der Partikelgrößenbestimmung wurde die Partikelsuspension mit ddH<sub>2</sub>O stark verdünnt und für 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Das Ultraschallgerät (BANDELIN SONOPLUS mini20, BANDELIN electronic, Berlin, Germany) wurde bei maximaler Leistung betrieben. Die Partikelgrößenverteilung wurde anschließend mit dem Laserbeugungsspektrometer HELOS (Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Germany) gemessen. Die Suspension wurde während der Messung dispergiert. Die Probenvorbereitungen sowie die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Anhand der Intensitätsverteilung des Beugungsmusters wurden mittels Fraunhofer-Theorie die Partikelgrößenverteilungen berechnet (WINDOX 5, Sympatec, Clausthal-Zellerfeld, Germany).

## 2.2.2 Konzentriertes Medium

Der Einfluss von Medienbestandteilen auf die Morphologie von *S. commune* wurde getestet. Dazu wurden sechs verschiedene Medien eingesetzt (Tab. 2.5). Alle Medienbestandteile wurden auch im Standardkomplexmedium verwendet. Die Medienbestandteile des Standardkomplexmediums wurden entweder einzeln in sechsfach erhöhter Konzentration oder gemeinsam in diesen hohen Konzentrationen eingesetzt.

**Tab. 2.5:** Variation der Konzentrationen von Medienbestandteilen in sechs verschiedenen Medien für die Kultivierung von *S. commune*. Die vier verschiedenen Medienbestandteile werden auch im Standardkomplexmedium (Referenz) eingesetzt und haben dort folgende Konzentrationen: Glucose (30 g/L), THE (3 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L),  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  (0,5 g/L). Bestandteile, die mit einem **X** gekennzeichnet sind, wurden jeweils in, gegenüber dem Standardkomplexmedium, 6-fach erhöhter Konzentration eingesetzt.

Medienbestandteile	Medium Nr.					
	1	2	3	4	5	6
Glucose				X		X
THE	X				X	X
$\text{KH}_2\text{PO}_4$		X			X	X
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$			X		X	X

## 2.3 Mikroskopie und Bildauswertung

### 2.3.1 Manuelle Mikroskopie

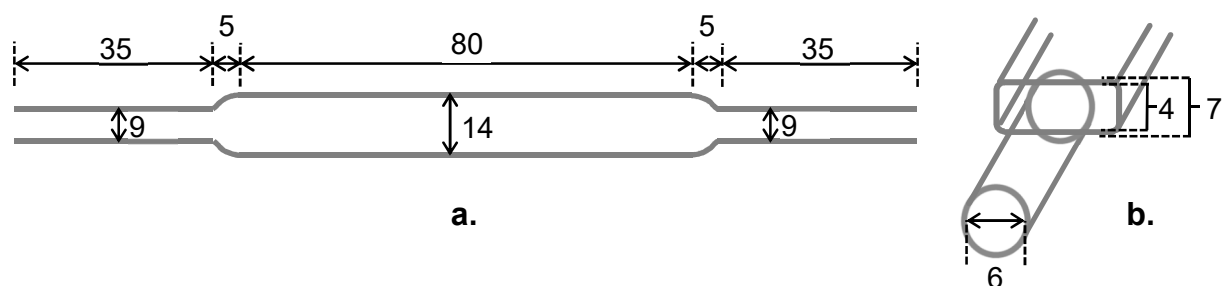
Die Pellets wurden in Petrischalen mit Wasser verdünnt und durch Schwenken gleichmäßig verteilt und vereinzelt. Bei Mikroskopie von Kulturen, deren Medium Mikropartikel enthielt, wurden diese durch Spülen der Kultur in einem feinmaschigen Sieb vor der Mikroskopie herausgewaschen. Lagen sehr kleine Pellets in der Kultursuspension vor, so wurde durch mehrmaliges Sedimentieren (im Schwerfeld) und Dekantieren des partikelhaltigen Überstands eine Abtrennung von den Partikeln vorgenommen.

Die Mikroskopie vereinzelt vorliegender Pellets erfolgte in Petrischalen im Dunkeln. Für die Mikroskopie kam das Stereomikroskop Discovery.V8 der Firma Carl Zeiss (Jena, Germany) zum Einsatz. Die Pellets wurden im Dunkelfeld bei maximaler

Beleuchtung und einer Belichtungszeit von 1 ms mit der auf dem Mikroskop montierten Kamera AxioCam MRc (Carl Zeiss) fotografiert. Es wurde das Objektiv Plan S 1.0x FWD 81 mm (Carl Zeiss) verwendet. Das zur Bildaufnahme verwendete Programm AxioVision SE64 Rel. 4.8 (Carl Zeiss) wurde in der Einstellung „linear“ betrieben, sodass die Graustufen von 0 bis 255 linear verteilt sind, d. h. keine Graustufen durch andere ersetzt wurden. Die Bilder wurden im tif-Datei-Format gespeichert. Für die Darstellung der Bilder in der vorliegenden Arbeit wurden Gammakorrekturen vorgenommen, sodass der Kontrast, im Gegensatz zur Auswertung, für das menschliche Auge erhöht wurde. Dazu wurde im AxioVision-Programm der Modus „G0.45“ für die Bildaufnahme gewählt.

### 2.3.2 Mikroskopie im Durchfluss

Die Mikroskopie im Durchfluss erfolgte nicht in Petrischalen, sondern in einer Durchflusskuvette (Schmidt Laborbedarf, Braunschweig, Germany). Abbildung 2.1 zeigt die Abmessungen der Kuvette.

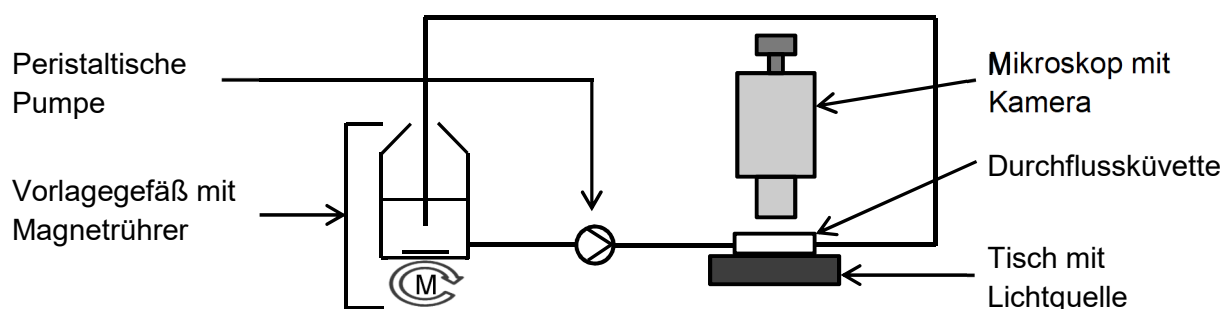


**Abb. 2.1:** Glaskuvette zur Mikroskopie von Pilzpellets im Durchflussverfahren. Draufsicht (a.) sowie seitliche Ansicht von der Schlauchstutzenöffnung aus (b.). Abmessungen in mm.

Anstatt des AxioVision-Programms wurde bei der Mikroskopie im Durchflussverfahren das Programm ZEN lite 2012 (blue edition) (Carls Zeiss) verwendet. Dieses wurde für die automatische Bildaufnahme im Zeitreihenmodus betrieben. Es wurde eine Bildaufnahme rate von 162 Bildern pro Minute gewählt. Die Aufnahmen wurden meist für eine Dauer von 7,4 min durchgeführt, sodass 1200 Bilder je Probe gemacht wurden. Bei abweichender Aufnahmedauer der automatischen Mikroskopie ist dies an entsprechender Stelle vermerkt.



Die Pellets wurden bei verschiedenen Förderraten einer peristaltischen Pumpe (Schlauchpumpe MCP *Process* IP 65 ISM 915A, Pumpenkopf ISM785A Pro-280, Schlauch Tygon Standard R-3603 mit 8,0 mm Innendurchmesser, Außendurchmesser 11,2 mm; IDEX Health and Science, Wertheim, Germany) durch die Glasküvette (Abb. 2.1) gepumpt. Als Vorlagebehälter diente eine 1 Liter-Schottflasche mit seitlich kurz über dem Flaschenboden eingearbeitetem Auslass, durch welchen die Pelletsuspension aus dem Behälter gepumpt wurde. Zur Vermeidung der Entstehung von Luftblasen wurden wenige Tropfen eines Entschäumers (STRUKTOL SB 2033, Schill + Sailacher, Hamburg, Germany) in die Flasche gegeben und anschließend vorsichtig 500 mL dH<sub>2</sub>O (ggf. etwas weniger, je nach zuzugebender Menge an Pilzsuspension) in die Flasche gefüllt. Die Pilzsuspension wurde hinzugegeben und die darin vorliegenden Pellets bei 100 min<sup>-1</sup> mit einem Magnetrührer gleichmäßig verteilt. Lagen sehr kleine Pellets in hochviskoser Suspension vor, so wurde die Pilzsuspension ggf. in einem Falcongefäß mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und durch vorsichtiges Schwenken die Pellets darin voneinander getrennt. Das Schlauchsystem wurde anschließend zunächst für 30 s bei einer Durchflussrate von 600 mL/min mit der Suspension gefüllt und nach jedem Versuch erneut für 30 s bei 600 mL/min durchgespült, um Luftblasen abzulösen und aus dem Schlauch zu spülen. Die Pellets wurden im Kreis gefördert, d.h. der auf der Rückseite der Küvette angebrachte Schlauch wurde in die Flasche zurückgeführt (Abb. 2.2). Der Schlauch wurde so angebracht, dass er zur, dem Auslass gegenüberliegenden Flaschenwand, zeigte. Das Schlauchende befand sich bei der 250-mL-Markierung der Flasche.



**Abb. 2.2:** Aufbau der Mikroskopie im Durchflussverfahren zur Darstellung von Pellets von *S. commune*.

Mit Hilfe eines **Central Composite Face-centered** Versuchsplans, nachfolgend als CCF-Versuchsplan bezeichnet, wurden Abweichungen in verschiedenen

morphologischen Parametern zwischen der manuellen Mikroskopie der Pellets und der Mikroskopie der Pellets im Durchfluss untersucht. Dabei wurden, wie in Tabelle 2.6 und 2.7 gezeigt, die Belichtungsdauer der Kamera und die Förderrate der Pumpe variiert. Für diese Untersuchungen wurden in jedem Einzelversuch (Tab. 2.6) dieselben Pellets verwendet. Die Pellets wurden zudem zunächst manuell in Petrischalen mikroskopiert und dann für die Mikroskopie im Durchfluss in den Vorlagebehälter überführt. Es wurden insgesamt 315 Pellets mikroskopiert. Von den Werten für im Durchfluss gemessenen morphologischen Parameter wurden die Werte subtrahiert, die bei der manuellen Mikroskopie gemessen wurden.

**Tab. 2.6:** CCF-Versuchsplan mit codierten Faktoreinstellungen zur Bestimmung des Einflusses von Belichtungsdauer und Pumpenförderrate während der Mikroskopie im Durchfluss. Der Einfluss auf verschiedene morphologische Parameter  $i$  wurde bestimmt, indem vom im Durchfluss gemessenen Wert des Parameters ( $y_a$ ) der per Hand gemessene Wert des Parameters ( $y_b$ ) abgezogen wurde.

Experiment Nr.	Belichtungsdauer [ms]	Förderrate Pumpe [mL/min]	$y_{ai} - y_{bi}$
1	-1	-1	Werte, für die im Durchfluss (a) gemessenen morphologischen Parameter $i$ abzüglich per Hand (b) gemessener Werte für die Parameter $i$ .
2	-1	0	
3	-1	+1	
4	0	-1	
5	0	0	
6	0	+1	
7	+1	-1	
8	+1	0	
9	+1	+1	

**Tab. 2.7:** Codierung der Faktoren Belichtungsdauer und Pumpenförderrate im CCF-Design.

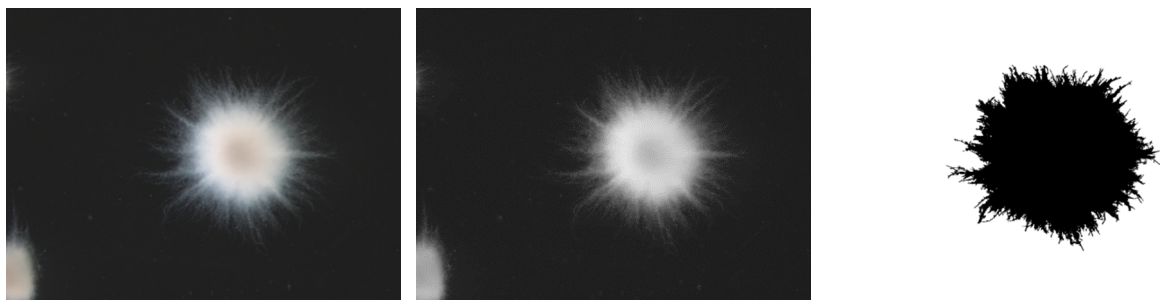
Normierte Werte	-1	0	+1
Belichtungsdauer [ms]	0,4	1,0	1,6
Förderrate Pumpe [mL/min]	200	300	400

Machbarkeitsuntersuchungen bzgl. einer automatischen Pelletkonzentrationsbestimmung wurden bei Einstellungen vorgenommen, die sich zur Bestimmung von makromorphologischen Parametern als optimal erwiesen hatten. Frequenz und Dauer der Zeitreihenaufnahmen wurden ebenfalls nicht verändert.

### 2.3.3 Automatische Bildverarbeitung

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ. Hier ist exemplarisch die Auswerteroutine für 150 Bilder (number) bei einer 10-fachen Vergrößerung (distance) dargestellt.

```
run("Image Sequence...", "open=[...\\...\\... .tif] number=150 starting=1 increment=1  
scale=100 file=[] or=[] sort");  
run("Set Scale...", "distance=95.59999574300019 known=1 pixel=1 unit=mm");  
run("8-bit");  
setAutoThreshold("Default dark");  
//run("Threshold...");  
setThreshold(7, 255);  
run("Analyze Particles...", "size=0.2-10000000000 circularity=0.00-1.00  
show=Outlines display exclude stack");  
run("Summarize");  
saveAs("Results", "...\\...\\Results.xls");
```



**Abb. 2.3:** Schritte der automatischen Bildverarbeitung. Mikroskopische Aufnahme eines Pellets von *S. commune* (Originalaufnahme links), Bild nach Konvertierung in 8-bit Version (Mitte) und daraus erstelltes binäres Bild (rechts) nach automatischem Setzen des thresholds, automatischer Entfernung von kleinen Objekten ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) sowie den Bildrand schneidenden Objekten.

Es wurden die folgenden morphologischen Parameter ausgewertet:

A) Projizierte Pelletfläche (PPF): Fläche aller zusammenhängenden Pixel eines Objekts.

B) Pelletumfang (p): Gesamtlänge der äußersten Pixel eines Pellets.

C) Rauheit (S): Verhältnis von projizierter Pelletfläche zur Fläche einer convexen Hülle, die das Pellet umgibt. Je rauer ein Objekt, umso geringer der Grauwert. Ein vollständig glattes Pellet würde einen Wert von 1 aufweisen. Eine Hyphe in Form eines Strichs hätte einen Wert von 0.

$$S = \frac{\text{PPF}}{\text{konvexe Projektionsfläche}} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

D) Rundheit (R): Je runder ein Pellet, desto näher liegt der Wert an 1. Je länglicher ein Pellet, umso geringer der Wert.

$$R = 4 \cdot \frac{A}{\pi \cdot (\text{Hauptachse})^2} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

mit Hauptachse = Hauptachse der das Pellet am besten anpassenden Ellipse

E) Homogenität der Pelletgrößenverteilung (H): Eine perfekt homogene Verteilung, in der alle Pellets die gleiche Größe aufweisen, hätte einen Wert von 0. Je homogener die Verteilung umso größer ist der Homogenitätswert.

$$H = \frac{\text{PPF}}{\sigma} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Zur Berechnung wurde die projizierte Pelletfläche durch die Standardabweichung  $\sigma$ , die direkt aus der Varianz der Pelletgrößenverteilung ermittelt werden kann, geteilt.

$$\sigma^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{korrigierte Stichprobenvarianz}) \quad (\text{Gl. 2.4})$$

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} \quad (\text{korrigierte Standardabweichung der Stichprobe}) \quad (\text{Gl. 2.5})$$

mit  $x_i$  : i-te Projizierte Pelletfläche

F) Grauwert (G): Der Grauwert gibt an wie dunkel bzw. hell ein Pellet erscheint. Der Grauwert kann Werte zwischen 0 (schwarz) und 255 (weiß) annehmen. Für jedes Pellet wurde genau ein Grauwert ermittelt, indem der Mittelwert aus den Grauwerten aller Pixel eines Pellets berechnet wurde. Aus diesem Wert wurde wiederum der Mittelwert für alle Pellets einer Probe berechnet. Dieser Wert ist nachfolgend als Grauwert der Pellets bezeichnet.

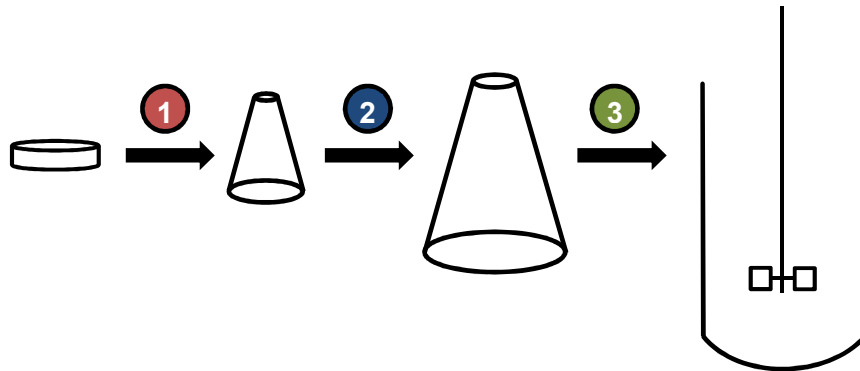
#### **2.3.4 Pelletkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Pelletkonzentration wurde entweder durch manuelles Auszählen der Pellets in unverdünnter Probe auf einer Platte mit dunklem Untergrund vorgenommen oder für Pellets aus erster Vorkultur mit Hilfe der automatisierten Mikroskopie (Kap. 2.3.2). Wurde die Bestimmung der Pelletkonzentration durch manuelles Auszählen vorgenommen, so betrug das untersuchte Volumen der unverdünnten Probe 5 mL, wenn eine Konzentration von maximal 100 Pellets/mL erwartet wurde. Bei Konzentrationen über 100 Pellets/mL wurden die Pellets in einem geringeren Volumen von 1 mL unverdünnter Probe ausgezählt.

Bei sehr hohen Konzentrationen bzw. bei sehr kleinen Pellets oder für Pelletbruchstücke, die aufgrund der Homogenisierung entstanden, wurde die Pelletkonzentrationsbestimmung bzw. die Bestimmung der Fragmentkonzentration vorgenommen, indem die Suspension zunächst mit dH<sub>2</sub>O verdünnt wurde. Es wurden je Probe insgesamt 30 mL verdünnte Probe hergestellt. Die verdünnte Suspension wurde anschließend auf zwei Petrischalen verteilt (1:1). Der Verdünnungsfaktor wurde so gewählt, dass keine Überlappungen zwischen den Pellets bzw. den Pelletfragmenten zu erkennen waren. Über die Anzahl der aufgenommenen Bilder und die Fläche der Bildausschnitte wurde auf die Anzahl aller Pellets je Petrischale geschlossen. Die Petrischale wurde Stück für Stück über den Mikroskoptisch gezogen, sodass möglichst viele Aufnahmen entstanden, jedoch keine Bereiche mehrmals mikroskopiert wurden. Zudem wurden auch den Bildrand schneidende Pellets bzw. Pelletfragmente mitgezählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pellets nur oben und rechts die Bildkante schnitten. Pellets, welche unten oder links den Bildrand schnitten wurden vorsichtig aus dem Bereich der Aufnahme entfernt. Dadurch wurde gewährleistet, dass keine Pellets mehrfach gezählt wurden, wenn ein Bildausschnitt direkt an den nächsten angrenzte.

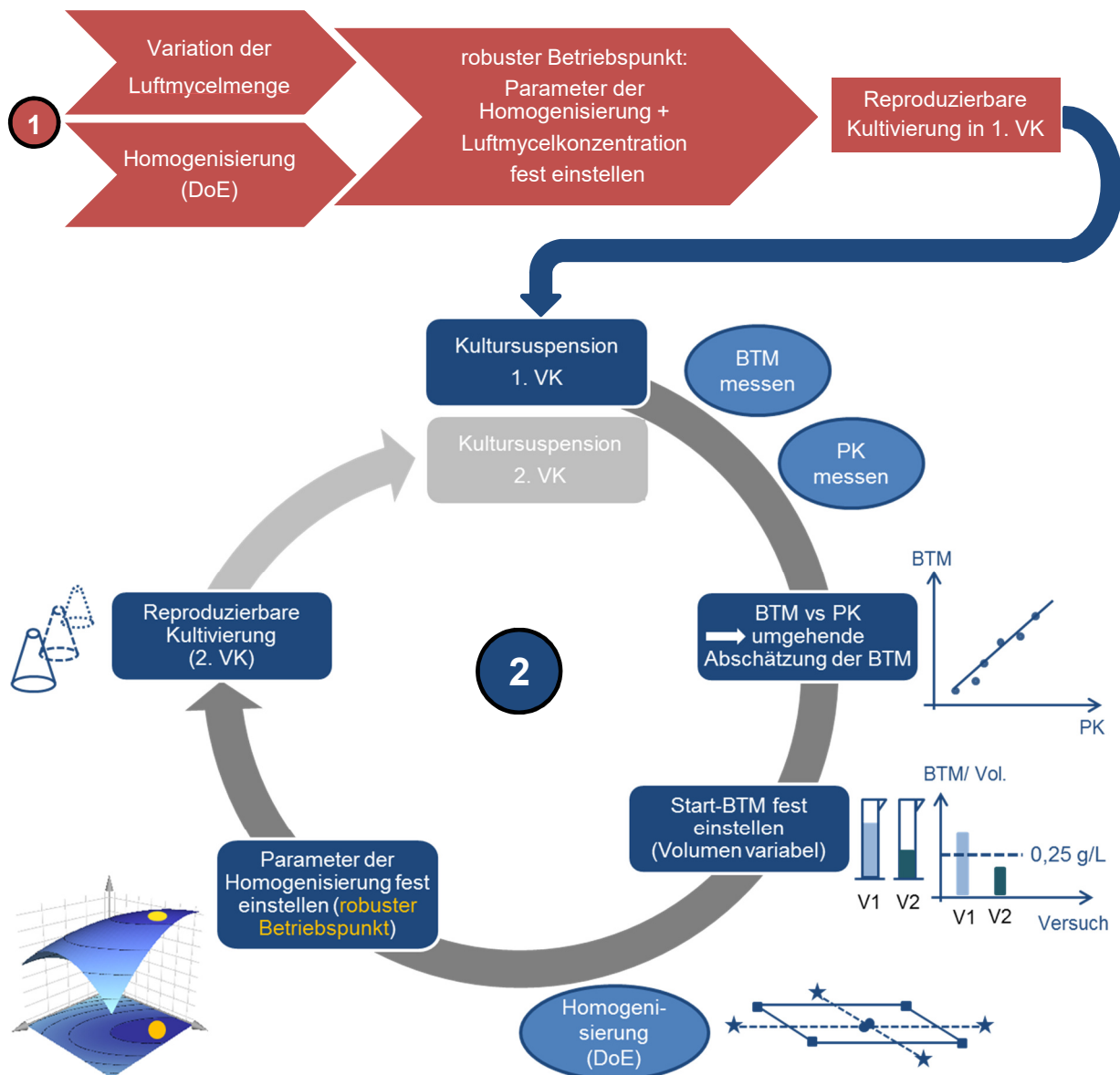
## 2.4 Entwicklung eines reproduzierbaren Kultivierungsverfahrens

Um einen möglichst reproduzierbaren Kultivierungsprozess von *Schizophyllum commune* von der Agarplatte bis in den Reaktormaßstab zu entwickeln, wurde die Homogenisierung des Pilzmycels mit Hilfe von Rotor-Stator Dispergierern sowie die einzusetzende Inokulumkonzentration eingehend untersucht. Das Vorgehen bei der Prozessentwicklung ist schematisch in Abbildung 2.4 und 2.5 zusammengefasst.



**Abb. 2.4:** Kultivierungsverfahren zur reproduzierbaren morphologischen Entwicklung von *S. commune*. Beimpfen der ersten Vorkultur mit Luftmycel von Agarplatten. Kultivierung in erster und zweiter Vorkultur (1. VK und 2. VK) in Schikanekolben mit 100 (500 mL Kolbenvolumen) und 200 mL (1000 mL Kolbenvol.) Arbeitsvolumen. Verfahrensentwicklung für die Schritte des Überimpfens in Abb. 2.5 dargestellt. Nach Kultivierung in 2. VK wurde die Reproduzierbarkeit des Verfahrens bei gleichzeitiger Untersuchung der Homogenisierung in Reaktorkultivierungen (3 L Arbeitsvolumen) getestet.

Ausgehend von einer mit Luftmycel von *S. commune* bewachsenen Agarplatte wurde eine erste Vorkultur beimpft. Das Luftmycel wurde dazu homogenisiert (Kapitel 2.4.2). Die Homogenisierung wurde bzgl. der Parameter Homogenisierungsdauer und Drehzahl mittels statistischer Versuchsplanung untersucht. Zudem wurde auch der Einfluss der verwendeten Menge an Luftmycel untersucht (Tab. 2.8 und 2.9). Ziel war es, einen möglichst robusten Betriebspunkt festzulegen. Der Betriebspunkt war dabei so zu wählen, dass sich eine nur geringfügige Änderung der Morphologie ergibt, wenn Veränderungen an Homogenisierung bzw. Inokulumkonzentration auftreten. Größere Abweichungen der Homogenisierungseinstellungen oder der Konzentration des Inokulums sollen somit nur zu möglichst geringen Änderungen an der Morphologie führen. In Abbildung 2.5 ist das detaillierte Vorgehen zur Entwicklung eines reproduzierbaren Verfahrens für alle Schritte des Überimpfens schematisch dargestellt.



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der Entwicklung einer reproduzierbaren Kultivierungsführung von *S. commune* für den Schritt des Beimpfens der ersten Vorkultur mit Luftmycel (1) und am Beispiel des Überimpfens von erster auf zweite Vorkultur (Schritt 2, siehe Abbildung 2.4). Die Pelletkonzentration (PK) in erster Vorkultur wurde mit der Biotrockenmasse (BTM) korreliert. Die Pelletkonzentrationsbestimmung ermöglichte somit die schnelle Abschätzung der BTM. Je nach vorliegender BTM in der ersten Vorkultur kann somit das Volumen des Inokulums angepasst werden, um eine feste BTM zu Beginn jeder Kultivierung in zweiter Vorkultur einzustellen. Auf Grundlage der festen Start-BTM wurden Drehzahl und Homogenisierungsdauer mittels statistischer Versuchsplanung (DoE) untersucht. Es wurde ein Betriebspunkt festgelegt, an dem sich die PK gegenüber Einstellungen der Homogenisierung nur wenig veränderte. Dieses Vorgehen wurde auch für Schritt 3 angewandt, um eine reproduzierbare Kultivierung im Reaktormaßstab zu erzielen.

Die in der Schüttelkultur in erster Vorkultur herangewachsenen Pilzpellets (maximale Reproduzierbarkeit) wurden anschließend homogenisiert (Kapitel 2.4.2). Auch hier

wurde wiederum der Einfluss von Homogenisierungsdauer und Drehzahl mittels statistischer Versuchsplanung untersucht (Tab. 2.10 und 2.11). Zudem wurde der Zusammenhang zwischen vorliegender Biotrockenmassekonzentration und der Konzentration der Pellets ermittelt. Damit sollte die Konzentration der Biomasse für die Inokulation (Start-BTM) der sich anschließenden Kultivierung abgeschätzt werden und damit bei Variation der BTM am Ende der ersten Vorkultur eine zuverlässige Einstellung der Start-BTM auf einen festen Wert ermöglicht werden.

Das gleiche Prozedere wurde auch für die Kultursuspension aus zweiter Vorkultur durchlaufen (Schritt 3). Die Homogenisierung wurde hier jedoch nicht vor dem Hintergrund eines robusten Betriebspunktes untersucht, sondern um den Einfluss von Drehzahl und Homogenisierungsdauer auf die Morphologie und weitere Parameter zu beschreiben. Abschließend wurde die Reproduzierbarkeit des gesamten Verfahrens anhand der statistischen Versuchsplanung ermittelt.



## 2.4.1 Statistische Versuchsplanung

Es wurden sowohl Screening- als auch Optimierungspläne eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MODDE (Umetrics, Umeå, Sweden). Ein **Central Composite Circumscribed Design**, nachfolgend als CCC-Versuchsplan bezeichnet, wurde verwendet, um den Schritt 1 in Abbildung 2.4 und 2.5 zu beschreiben. In Tabelle 2.8 ist die Faktorkodierung eingetragen und Tabelle 2.9 zeigt den Versuchsplan. Die Versuche wurden in zufällig gewählter Reihenfolge ausgeführt. Der Versuchsplan ist drehbar und orthogonal. Der Faktor  $\alpha$  berechnet sich aus  $\alpha^2 = \sqrt{(2^k)}$  mit k gleich der Anzahl an untersuchten Faktoren.

**Tab. 2.8:** Codierung der Faktoren im CCC-Versuchsplan (Tab. 2.9).

Normierte Werte	-1,682 ( $\alpha$ )	-1	0	+1	1,682 ( $\alpha$ )
Drehzahl [Upm]	618	1300	2300	3300	3982
Zeit [s]	59	120	210	300	361
Inokulummenge [cm]	0,795	1	1,3	1,6	1,805

**Tab. 2.9:** CCC-Versuchsplan mit codierten Faktoreinstellungen zur Untersuchung der Auswirkung der eingesetzten Menge an Luftmycel im Inokulum der ersten Vorkultur und der Homogenisierungsparameter Drehzahl sowie Dauer der Homogenisierung (Zeit) zur Homogenisierung des Luftmycels.

Experiment Nr.	Drehzahl	Zeit	Inokulummenge
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,682	0	0
10	1,682	0	0
11	0	-1,682	0
12	0	1,682	0
13	0	0	-1,682
14	0	0	1,682
15-23	0	0	0

In Schritt 2 wurden, wie Abbildung 2.5 zeigt, die Konzentration des Inokulums und deren Homogenisierung getrennt voneinander untersucht. Zunächst wurde eine Inokulumkonzentration ausgewählt, für welche anschließend die Homogenisierung mit Hilfe eines CCC-Versuchsplans untersucht wurde.

Tabelle 2.10 fasst die Kodierung der Homogenisierungsparameter zusammen. In Tabelle 2.11 ist der Versuchsplan mit den Einzelexperimenten, die in zufälliger Reihenfolge ausgeführt wurden, aufgelistet.

**Tab. 2.10:** Codierung der Faktoren im CCC-Versuchsplan (Tab. 2.11).

Normierte Werte	-1,414 ( $\alpha$ )	-1	0	+1	1,414 ( $\alpha$ )
Drehzahl [Upm]	1750	2370	3870	5370	5990
Zeit [s]	30	50	100	150	170

**Tab. 2.11:** CCC-Versuchsplan mit codierten Faktoreinstellungen zur Untersuchung der Homogenisierungsparameter Drehzahl sowie Dauer der Homogenisierung (Zeit) für die Homogenisierung von Kultursuspension aus erster Vorkultur.

Experiment Nr.	Drehzahl	Zeit
N1	-1	-1
N2	+1	-1
N3	-1	+1
N4	+1	+1
N5	-1,414	0
N6	+1,414	0
N7	0	-1,414
N8	0	+1,414
N9	0	0
N10	0	0

Auch in Schritt 3 wurden die Konzentration des Inokulums und die Homogenisierung getrennt voneinander untersucht. Um aufzuklären, wie sich die Homogenisierung auf die in der anschließenden Reaktorkultivierung gebildete Pelletgröße und weitere morphologische sowie klassische Parameter der Kultivierung auswirkt, wurde ein vollfaktorieller Versuchsplan (**Full Factorial Design**) verwendet; nachfolgend als FF-Versuchsplan bezeichnet. Der Versuchsplan wurde zweifach ausgeführt, d.h. es wurde jeweils zweimal die gleiche Homogenisierung durchgeführt (siehe z.B. Versuch N1.1

und N1.2 in Tab. 2.13). Dazu kamen jeweils unabhängig voneinander angezogene Kultursuspensionen aus zweiter Vorkultur zum Einsatz.

**Tab. 2.12:** Codierung der Faktoren im FF-Versuchsplan (Tab. 2.13).

Normierte Werte	-1	0	+1
Drehzahl [Upm]	8000	16000	24000
Zeit [min]	1	3,5	6

**Tab. 2.13:** FF-Versuchsplan mit codierten Faktoreinstellungen zur Untersuchung der Homogenisierungsparameter Drehzahl und Zeit (Dauer der Homogenisierung) für die Homogenisierung von Kultursuspension aus zweiter Vorkultur.

Experiment Nr.	Drehzahl	Zeit
N1.1, N1.2	-1	-1
N2.1, N2.2	-1	+1
N3.1, N3.2	+1	-1
N4.1, N4.2	+1	+1
N5.1, N5.2	0	0
N6.1, N6.2	0	0
N7.1, N7.2	/	/

Die Korrelationen, die mittels multipler linearer Regression (MODDE) vorgenommen wurden, um verschiedene Zielparameter wie beispielsweise die projizierte Pelletfläche von *S. commune* zu beschreiben, wurden in *Response Surface* Graphen dargestellt. In diesen Abbildungen wurden nur diejenigen Teile dargestellt, die ohne Extrapolation der errechneten Modelle abgebildet werden konnten.

Aus den Regressionsmodellen berechnete Werte für eine bestimmte Zielgröße sind mit einem Vorhersageintervall ( $\alpha = 0,05$ ) angegeben.

Mit folgenden statistischen Größen konnten die Regressionsgüte ( $R^2$ ), die Vorhersagegüte ( $Q^2$ ), die Modellvalidität (M) und die Reproduzierbarkeit (Rep) der errechneten Modelle vorhergesagt werden.

Die Größe  $R^2$  beschreibt wie groß der durch das Modell erfasste Anteil an der Gesamtvarianz für die Messwerte einer Zielgröße ist.

$$R^2 = \frac{SS_{\text{Regression}}}{SS_{\text{Total corrected}}} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

mit SS = Sum of squares

(es gilt  $SS_{\text{Total corrected}} = SS_{\text{Regression}} + SS_{\text{Residual}}$ )

$Q^2$  beschreibt die Vorhersagegüte des Modells.  $Q^2$  kann im Gegensatz zu  $R^2$  auch Werte kleiner 0 annehmen (sehr schlechte Vorhersagegüte).

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{SS_{\text{Total corrected}}} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

mit  $\text{PRESS} = \sum_i (y_i - [\ ]_{\text{ipredicted}})^2$

(es gilt:  $[\ ]_{\text{ipredicted}}$  = vorhergesagter Wert von  $y_i$  mit einem Modell, das ohne Beobachtung  $i$  gefittet wurde)

Die Modellvalidität  $M$  gibt an, ob der Fehler des Modells größer ist als der experimentelle Fehler. Dies ist für Werte kleiner als 0,25 der Fall.

$$M = 1 + 0,57647 \cdot \log(\text{plof}) \quad (\text{Gl. 2.8})$$

mit plof = p-Wert für „Lack of Fit“/Modellfehler

Die Reproduzierbarkeit (Rep) gibt an, welche Abweichungen sich bei Durchführung gleicher Experimente (z.B. Centerpunktexperimente) ergeben.

$$\text{Rep} = 1 - \frac{MS_{\text{Pure error}}}{MS_{\text{Total corrected}}} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

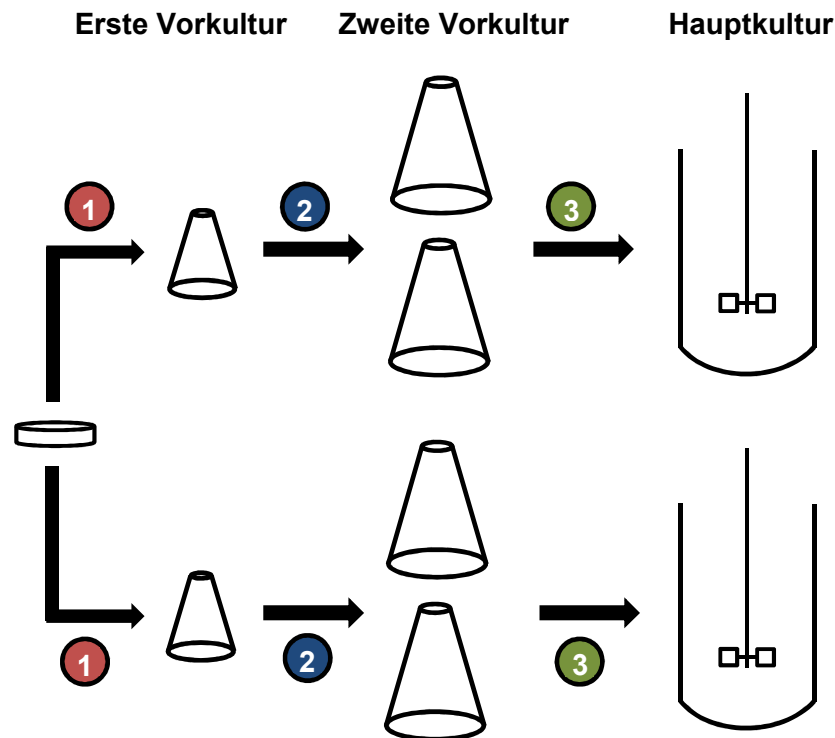
Die Reproduzierbarkeit kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Hohe Werte bedeuten eine gute Reproduzierbarkeit.

## 2.4.2 Homogenisierung von Luftmycel und Kultursuspension

Die Homogenisierung erfolgte sowohl für Luftmycel, als auch für Kultursuspension aus erster Vorkultur in Mischgefäßen mit einer Rotor-Stator-Dispergiereinheit (DT-50-M-gamma) der Firma IKA (Staufen, Germany). Das Mischgefäß wurde als Mischaufsatz verwendet und mit dem Ultra Turrax Tube Drive Control (IKA, Staufen, Germany) angetrieben. Beim Beimpfen mit Luftmycel wurden 30 mL Medium in den Mischaufsatz

vorgelegt und ein mit Luftmycel bewachsenes Agarstück hinzugegeben. Mit Hilfe von Korkbohrern verschiedener Größe konnten Agarstücke mit genau definierter Fläche hinzugegeben werden. Zum Zerkleinern von Pellets aus erster Vorkultur wurden 30 mL Suspension in das Mischgefäß gefüllt und homogenisiert. Wurde Kultursuspension aus zweiter Vorkultur homogenisiert, die zum Beimpfen von Fermentationen im Reaktormaßstab verwendet wurde, kam ebenfalls eine auf dem Rotor-Stator-Prinzip basierende Homogenisierung zum Einsatz. In diesem Fall wurde jedoch ein von oben angetriebener Ultra-Turrax-Stab (T25) der Firma IKA verwendet. Ein 600 mL Becherglas ( $h = 15,5 \text{ cm}$ ;  $d = 8,0 \text{ cm}$ ) wurde mit 300 mL Kultursuspension aus der zweiten Vorkultur gefüllt. Dazu wurde Kultursuspension aus zwei parallel durchgeführten Kultivierungen (jeweils 150 mL Vorkultur) im Verhältnis 1:1 in das Becherglas überführt. Anschließend wurde mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Um nach der Optimierung der einzelnen Verfahrensschritte die Homogenisierung unter reproduzierbaren Bedingungen für die anschließende Kultivierung im Reaktormaßstab zu testen, wurde das Kultivierungsverfahren unter den Bedingungen, die eine möglichst reproduzierbare Einstellung der Morphologie ermöglichen, nach dem Schema in Abbildung 2.6 durchgeführt. Dabei wurden von jeweils einer Agarplatte ausgehend zwei erste Vorkulturen beimpft. Mit der homogenisierten Kultursuspension aus jeweils einer ersten Vorkultur wurden je zwei Kultivierungen in zweiter Vorkultur beimpft. Die in zweiter Vorkultur angezogene Kultursuspension wurde im Verhältnis 1:1 vereinigt, bevor sie homogenisiert wurde. Mit dieser homogenisierten Suspension wurde ein Reaktor beimpft. Um die Reproduzierbarkeit des Kultivierungsverfahrens in der Reaktorkultivierung beurteilen zu können, wurden die parallel dazu durchgeführten Kultivierungen herangezogen.



**Abb. 2.6:** Kultivierungsablauf für die Untersuchung des Homogenisierungseffekts auf die Morphologie und Produktbildung in Reaktorkultivierungen (Schritt 3) unter maximal robusten Einstellungen in den Verfahrensschritten 1 und 2. Der Verlauf oben und unten sind identisch, um die Reproduzierbarkeit des Verfahrens zu überprüfen.

Nach Entwicklung des reproduzierbaren Kultivierungsverfahrens wurden die dabei ermittelten Homogenisierungsbedingungen (durch statistische Versuchsplanung ermittelt, um die Morphologie maximal reproduzierbar einzustellen), in Kultivierungen für weitere morphologische Untersuchungen angewendet. Wurde aufgrund einer spezifischen Fragestellung keine Homogenisierung vorgenommen oder die Homogenisierungsparameter verändert, so ist dies an entsprechender Stelle vermerkt.

## 2.5 Analytische Bestimmungen

### 2.5.1 Probenvorbereitung

Die Kultursuspension wurde im Anschluss an die Kultivierung bzw. während der Kultivierung mit deionisiertem Wasser so verdünnt, dass sich eine Polysaccharidkonzentration von etwa 0,5 – 1 g/L ergab. Dazu wurden wenige Gramm der Probe durch Ausschütten in ein Becherglas überführt. Ggf. wurde mit einer Pilzpipette oder Eppendorf-Pipettenspitze mit abgeschnittener Öffnung die

gewünschte Menge genau eingestellt. Es wurden so viel Gramm Kultursuspension überführt, dass zusammen mit dem zugegebenen Wasser zur Einstellung der Verdünnung insgesamt etwa 50 Gramm vorlagen. Die verdünnte Suspension wurde für 60 Sekunden mit dem Ultra-Turrax T25 bei  $18000 \text{ min}^{-1}$  homogenisiert. Alle Proben wurden bei Raumtemperatur verarbeitet. Die Kultursuspension wurde ggf. vorher erwärmt. Standardmäßig wurde die Konzentration der Biotrockenmasse, des gebildeten Polysaccharids sowie die des Substrats Glucose bestimmt.

### **2.5.2 Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse**

Von verdünnter und homogener Kultursuspension wurden 20 g ( $\pm 0,01 \text{ g}$ ) in vorgewogene Metallbecher überführt und 30 min bei  $20^\circ\text{C}$  und 13.000g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für die weitere Analytik in Falcon-Röhrchen verschlossen und gekühlt aufbewahrt. Das Sediment wurde anschließend einmal mit 10 mL deionisiertem Wasser gewaschen, homogenisiert (1 Minute mit Ultra-Turrax T25) und erneut zentrifugiert (30 min,  $20^\circ\text{C}$ , 13.000g). Anschließend wurde es über Nacht bei  $80^\circ\text{C}$  im Trockenschrank getrocknet. Die Metallbecher wurden danach für mindestens 60 Minuten im Exsikkator (Sico Star-Exsikkator, Bohlender, Grünsfeld, Germany) abgekühlt, bevor sie ausgewogen wurden. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Metallbecher wurden ausschließlich mit Handschuhen angefasst. Bei Verarbeitung von Kultursuspension mit Mikropartikeln, wurde der Überstand in weitere Metallbecher überführt und ein zweites Mal zentrifugiert, bevor er für die Fällung bzw. weitere Tests verwendet wurde. Das anfallende Sediment wurde wie oben beschrieben getrocknet und die Metallbecher anschließend ausgewogen.

### **2.5.3 Gravimetrische Polysaccharidbestimmung**

Es wurden jeweils 5 g Polysaccharidlösung in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und 15 mL Isopropanol zugegeben. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einem Stück Aluminiumfolie abgedeckt, kurz geschwenkt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die gesamte Suspension wurde in zuvor ausgewogene Metallbecher überführt und für 45 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  und 13.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment für 48 Stunden bei  $40^\circ\text{C}$  im Vakuumtrockenschrank bei max. -800 mbar (unter Atmosphärendruck) aufbewahrt. Die Metallbecher mit dem getrockneten

Polysaccharid wurden für mindestens 60 Minuten in den Exsikkator gestellt, bevor sie ausgewogen wurden. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Metallbecher wurden ausschließlich mit Handschuhen angefasst.

Um die Polysaccharidkonzentration auch in Proben aus Kultursuspensionen, in denen nur wenig Polysaccharid gebildet wurde, verlässlich bestimmen zu können, wurden die Polysaccharidkonzentration und die Konzentration von technischem Hefeextrakt in verschiedenen Kombinationen untersucht. Die Konzentration der weiteren Medienbestandteile einschließlich Glucose entsprach den in Tabelle 2.2 beschriebenen Konzentrationen. Daraus konnte ein einfacher Zusammenhang zwischen der eingestellten bzw. bekannten Polysaccharidkonzentration und der anschließend nach Fällung und durch gravimetrische Bestimmung (wie oben beschrieben) ermittelten Polysaccharidkonzentration hergestellt werden (Gl. 2.10).

$$c_{PS}(\text{vorliegend}) = \frac{c_{PS}(\text{gemessen}) - 1,12349}{1,11212} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

mit  $c_{PS}(\text{vorliegend})$  = Polysaccharidkonzentration, die in der Kultursuspension vorliegt

und  $c_{PS}(\text{gemessen})$  = gravimetrisch bestimmte Polysaccharidkonzentration

Die Polysaccharidkonzentration wurde immer nach dieser Gleichung berechnet, wenn mehr als 15 g/L Restglucose in der Kultursuspension enthalten waren.

Wurde für die Kulturen, welche in den konzentrierten Medien angezogen wurden (Tab. 2.5), die Polysaccharidkonzentration bestimmt, so wurden zusätzlich Referenzwerte bestimmt. Das entsprechende Medium wurde zunächst um den gleichen Faktor wie die Kultursuspension verdünnt. Anschließend wurde die Fällung mit Isopropanol parallel zu den Proben wie oben beschrieben durchgeführt. Die gravimetrisch bestimmten Referenzwerte wurden von den Werten, die für den Kulturüberstand ermittelt wurden, abgezogen.

#### **2.5.4 Bestimmung der Glucosekonzentration mit Dinitrosalicylsäure (DNS)**

Die eingesetzten Proben (Kulturüberstände) wurden mit deionisiertem Wasser auf eine Konzentration zwischen 0,5 und 1,0 g/L verdünnt. Zu jeweils 1 mL verdünnter Probe



wurde im Reagenzglas zusätzlich 1 mL deionisiertes Wasser gegeben. Dann wurden 2 mL DNS-Reagenz zugesetzt. Nach guter Durchmischung wurden die Reagenzgläser mit Alufolie abgedeckt und die Lösung für genau 15 Minuten bei 95 °C im Wasserbad erhitzt. Sofort nach Ablauf der Zeit wurden die Reagenzgläser für 5 Minuten in ein Eisbad gestellt. Nach weiteren 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde erneut gut durchmischt. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm (Libra S 12 UV/VIS, Biochrom, Cambridge, England) gemessen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Für die Herstellung von DNS-Reagenz wurden 1,06 M K-Na-tartrat·4H<sub>2</sub>O und 44 mM 3,5-Dinitrosalicylsäure über Nacht in 800 mL 0,4 molarer NaOH gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit dH<sub>2</sub>O auf einen Liter aufgefüllt. Die Lösung wurde lichtgeschützt angesetzt und ebenfalls lichtgeschützt aufbewahrt.

### **3 Ergebnisse**

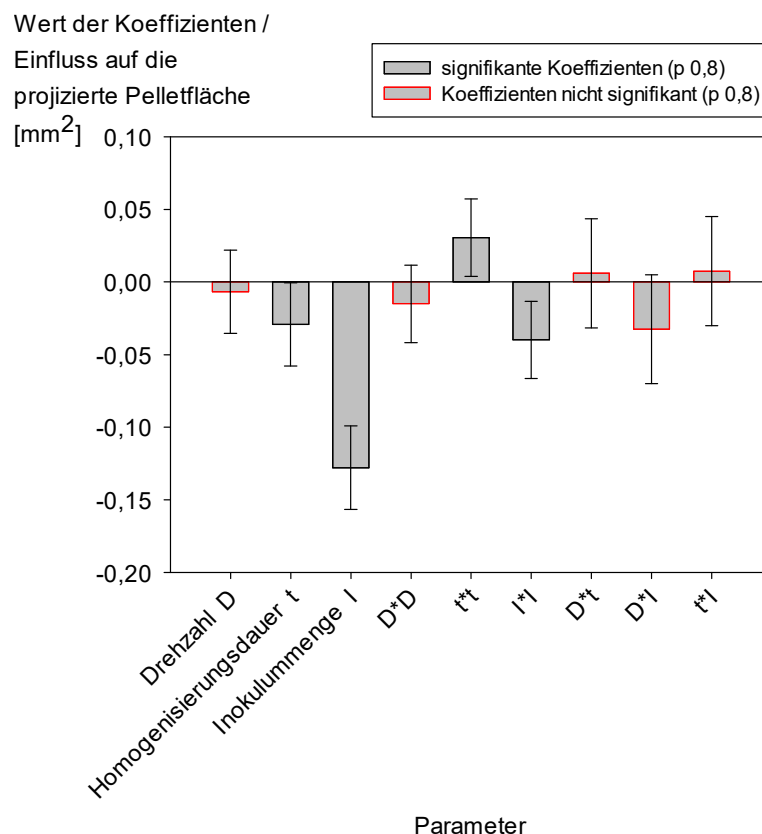
#### **3.1 Reproduzierbarkeit der Kultivierungsführung**

Die Reproduzierbarkeit der Kultivierung über mehrere Kultivierungsstufen hinweg ist ein entscheidendes Kriterium für robuste und reproduzierbare Produktionsprozesse. Sie stellt eine wichtige Grundlage für Kultivierungen im kontinuierlichen Verfahren dar. Vor Beginn der Untersuchungen wurde angenommen, dass die Homogenisierung des Luftmycels bzw. von Kultursuspension sich wesentlich auf die Morphologie auswirkt. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben wird, wirkt sich zudem auch die Inokulumkonzentration massiv auf die Morphologie des Pilzes aus. Damit assoziiert, änderten sich auch weitere Parameter. Ziel der Verfahrensoptimierung für eine reproduzierbare Kultivierungsführung war es somit zum einen die Konzentration des Inokulums möglichst konstant auf einen festen Wert einzustellen und dies mit einer möglichst einfachen Abschätzung mit Hilfe der Morphologieanalyse zu ermöglichen. Eine direkte Bestimmung (gravimetrisch) kann aufgrund des damit verbundenen Zeitaufwands nicht erfolgen. Zum anderen wurden die Homogenisierungsparameter untersucht, um einen möglichst robusten Betriebspunkt bzgl. der Einstellung der Parameter zu finden. D.h. es sollte ein Betriebspunkt ausgewählt werden, an dem Veränderungen der Homogenisierungseinstellungen nur geringe Veränderungen an der sich anschließend ausbildenden Morphologie nach sich ziehen. Alle Parameter wurden zudem auch vor dem Hintergrund realistischer Betriebsparameter festgelegt. D.h. die beeinflussenden Parameter wurden zusätzlich z.B. mit dem Ziel eine hohe Biomassebildung in den Vorkultivierungen zu generieren gewählt.

##### *Erste Vorkultur*

In Voruntersuchungen wurde bereits erkannt, dass die Intensität der Homogenisierung von Luftmycel (Drehzahleinstellung im Mischaufrührer) einen nur geringen Einfluss auf die Morphologie hatte. Ziel war es zudem in der ersten Vorkultur bereits möglichst kleine Pellets zu erhalten. In einem Vorversuch wurde dabei festgestellt, dass die kleinsten Pellets bei einer Homogenisierungsdauer von etwa drei Minuten gebildet wurden und dass bei längerer Homogenisierung (bis zu zehn Minuten) kaum noch eine Veränderung der projizierten Pelletfläche zu beobachten war. Später wurde ermittelt, dass auch die Inokulumkonzentration einen erheblichen Anteil an der Variation der Morphologie in der ersten Vorkultur hatte. Zur genaueren Untersuchung und

insbesondere zur Betrachtung potenzieller Abweichungen bei verschiedenen Parametereinstellungen wurde die statistische Versuchsplanung eingesetzt. Es wurde ein CCC-Versuchsplan verwendet, sodass auch quadratische und Interaktionseffekte beobachtet werden konnten. Die nachfolgende Abbildung zeigt den mit multipler linearer Regression errechneten Einfluss der Faktoren (skaliert) auf die projizierte Pelletfläche.



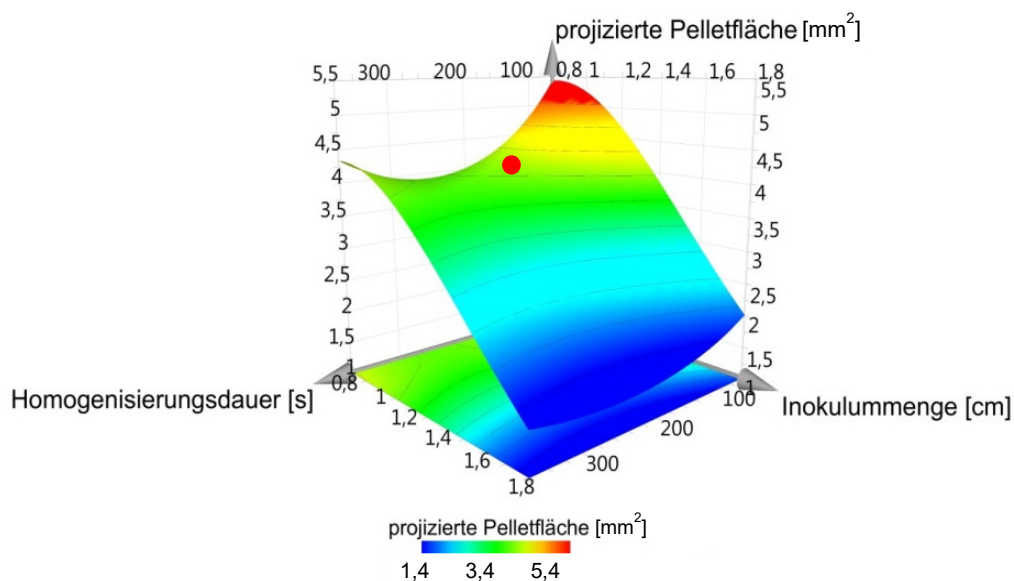
**Abb. 3.1:** Skalierte Modellkoeffizienten für den Einfluss von Drehzahl (D), Homogenisierungsdauer (t) und Inokulummenge (I) auf die projizierte Pelletfläche in erster Vorkultur von *S. commune*. Schneiden die dargestellten Vertrauensintervalle, in den Darstellungen die x-Achse, so waren die Modellkoeffizienten nicht signifikant und wurden für die Modellbildung nicht berücksichtigt (Signifikanzniveau  $\alpha=80\%$ ). Modellberechnung (multiple lineare Regression) auf Grundlage des in Tabelle 2.9 dargestellten Versuchsdesignplans.

Da die Menge des Inokulums I, welche als Durchmesser des verwendeten Korkbohrers in das Modell einging, sich von der tatsächlichen Menge unterscheidet, indem diese sich quadratisch mit dem Durchmesser erhöht (Quadratzentimeter mit Luftmycel bewachsenen Agars), wurde die projizierte Pelletfläche logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erreichen. Dem berechneten Modell zufolge hatte die eingesetzte Menge an Inokulum den größten Einfluss auf die projizierte Pelletfläche. Sowohl der lineare als auch der quadratische Term haben ein negatives Vorzeichen.

Mit einer Erhöhung der Menge an Inokulum nahm die projizierte Pelletfläche somit ab. Die Homogenisierungsdauer bewirkte gemäß dem errechneten Modell, dass die projizierte Pelletfläche je nach untersuchtem Bereich absank oder anstieg (Kombination aus negativem linearem und positivem quadratischem Term). An der Höhe der Werte der skalierten Faktoren lässt sich direkt ablesen, dass der Einfluss der Homogenisierungsdauer auf die projizierte Pelletfläche geringer war, als der Einfluss der Inokulumkonzentration. Für die Drehzahl und somit die Intensität der Homogenisierung wurden in dem untersuchten Bereich nur nicht signifikante Einflüsse festgestellt. In Gleichung 3.1 können die Werte für die Modellparameter direkt eingesetzt werden.

$$PPF = \log_{10}(0,5394 - 0,0019 \cdot t + 0,7227 \cdot I + 3,78 \cdot 10^{-6} \cdot t^2 - 0,4419 \cdot I^2) \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Die graphische Darstellung von Gleichung 3.1 ergibt den nachfolgenden Response-Surface-Plot (Abb. 3.2).

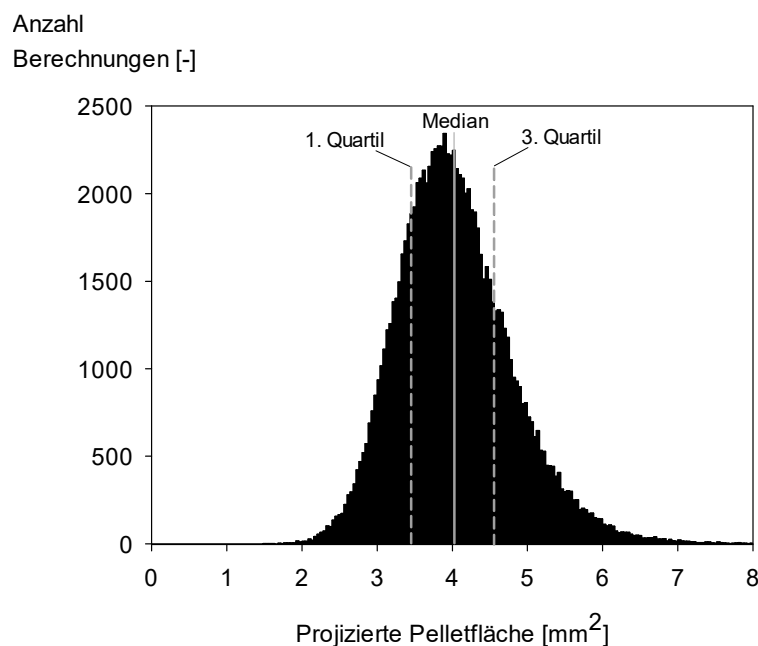


**Abb. 3.2:** Abhängigkeit der projizierten Pelletfläche von der Homogenisierungsdauer und der Menge des verwendeten Inokulums (angegeben als Durchmesser des zum Ausstechen von Luftmycel verwendeten Korkbohrers) in erster Vorkultur von *S. commune*. Der rote Punkt kennzeichnet einen Bereich hoher Robustheit gegenüber Veränderungen der Einflussparameter (Inokulummenge = 1,0 cm, Homogenisierungsdauer  $t = 180$  s).

Bei geringen Inokulummengen nahm die projizierte Pelletfläche mit zunehmender Homogenisierungsdauer von über 5 mm<sup>2</sup> zunächst deutlich ab. Bei Verwendung eines 0,78 cm<sup>2</sup> (Durchmesser des Korkbohrers 1,0 cm) großen Agarstücks und einer Homogenisierungsdauer von 260 Sekunden wurde ein Minimum von 3,8 mm<sup>2</sup>

durchlaufen, bevor es bei längerer Homogenisierung wieder zu einem leichten Anstieg der projizierten Pelletfläche von *S. commune* kam. Bei Verwendung hoher Inokulumkonzentrationen hatte die Homogenisierungsdauer fast keinen Einfluss mehr auf die Größe der gebildeten Pellets. Wurden 2,56 cm<sup>2</sup> große Agarstücke eingesetzt (Durchmesser des Korkbohrers 1,805 cm), so lag die projizierte Pelletfläche bei nur 1,8 cm<sup>2</sup> (100 s) bzw. 1,6 cm<sup>2</sup> (360 s). Das Minimum von 1,5 cm<sup>2</sup> lag bei einer Homogenisierungsdauer von 250 Sekunden. Eine weitere Erhöhung der Inokulumkonzentration führte zur Bildung noch kleinerer Pellets (vgl. Kap. 3.2.1). Dies war hier jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Die nächste Abbildung zeigt die zu erwartende Pelletgrößenverteilung (Wahrscheinlichkeitsdichte) an dem robusten Punkt, der in Abbildung 3.2 eingezeichnet ist. Diese wurde durch eine Monte-Carlo-Simulation (iteratives Berechnungsverfahren) vorgenommen, indem der Modellfehler und die durch das Modell nicht zu beschreibende Varianz miteinbezogen wurden.

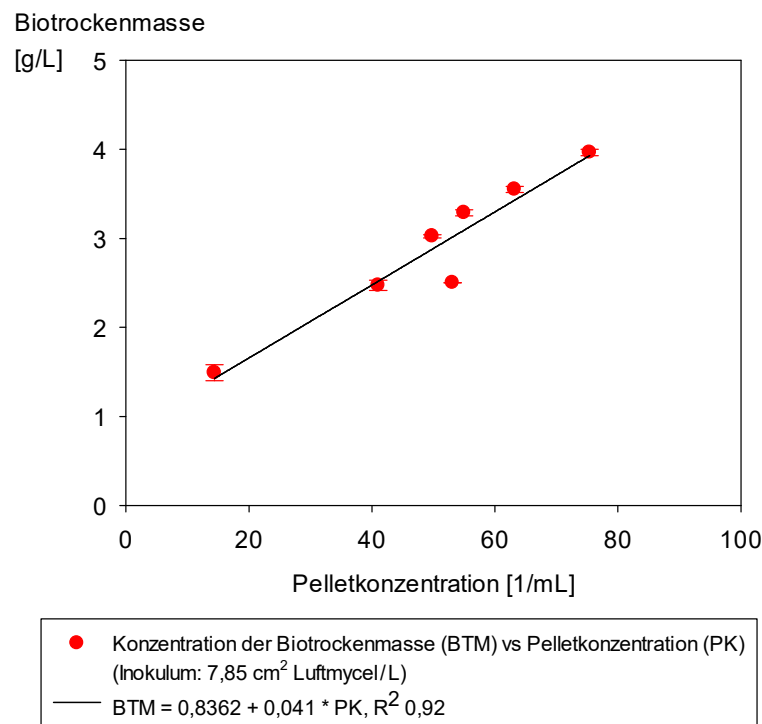


**Abb. 3.3:** Mittels Monte-Carlo-Simulation berechnete Verteilung der projizierten Pelletfläche auf Grundlage des berechneten Modells (vgl. Gl. 3.1) bei Verwendung eines Korkbohrers mit 1,0 cm Durchmesser und einer Homogenisierungsdauer von 180 s.

Die im Mittel gebildete projizierte Pelletfläche beträgt demnach etwas über 4 mm<sup>2</sup>. Jedoch könnten in 25 % der Experimente Pellets mit einer projizierten Pelletfläche kleiner als etwa 3,4 mm<sup>2</sup> auftreten und in weiteren 25 % ist mit Pellets größer als 4,5 mm<sup>2</sup> zu rechnen. In 10 % der Experimente könnte die durchschnittlich gebildete

projizierte Pelletfläche sogar kleiner als 3,1 mm<sup>2</sup> bzw. größer als 5,0 mm<sup>2</sup> sein. Somit bestanden in der ersten Vorkultur von *S. commune* selbst bei Wahl eines möglichst robusten Betriebspunktes deutliche Abweichungen in der projizierten Pelletfläche. Wie in Kapitel 3.2.1.1 in Abbildung 3.13 gezeigt ist, korreliert die projizierte Pelletfläche mit der Pelletkonzentration. Somit muss also auch die Pelletkonzentration an dem untersuchten Punkt variieren. In sieben Einzelversuchen bei den definierten Einstellungen (180 s, 4000 Upm, 7,85 cm<sup>2</sup> Luftmycel/L) wurden auch deutliche Unterschiede in der Pelletkonzentration gefunden (Abb. 3.4). Gegen die Konzentration der Pellets wurde die Biotrockenmassekonzentration aufgetragen. Diese nahm linear mit der ansteigenden Zahl der Pellets in der Kultursuspension zu (Gl. 3.2).

$$BTM = 0,8362 + 0,041 \cdot PK \quad (\text{Gl. 3.2})$$



**Abb. 3.4:** Konzentration der Biotrockenmasse in Abhängigkeit der Pelletkonzentration in erster Vorkultur von *S. commune* in sieben Kultivierungen, die jeweils mit 7,85 cm<sup>2</sup> Luftmycel/L beimpft wurden. Homogenisierung des Luftmycels für jeweils 180 s bei 4000 min<sup>-1</sup>.

Mit Hilfe dieser Gleichung kann die Biomasse durch Auszählen der Pellets direkt abgeschätzt werden. Diese Abschätzung ermöglichte es, trotz variierender Biomasse in der ersten Vorkultur, eine möglichst konstante Biomassekonzentration zu Kultivierungsbeginn im folgenden Kultivierungsschritt einzusetzen, indem das Volumen des Inokulums zum Beimpfen für den folgenden Kultivierungsschritt angepasst wurde. Die Konzentration der Biomasse möglichst konstant einzustellen, ist

für eine reproduzierbare Kultivierungsführung auch in zweiter Vorkultur ein wesentlicher Faktor. Treten Veränderungen der Inokulumkonzentration auf, so verändert sich auch die Morphologie (vgl. z.B. Abb. 3.11). Damit zusammenhängend wiederum verändern sich Parameter wie beispielsweise die gebildete Biomasse oder auch die Raum-Zeit-Ausbeute (vgl. Abb. 3.14 und 3.15).

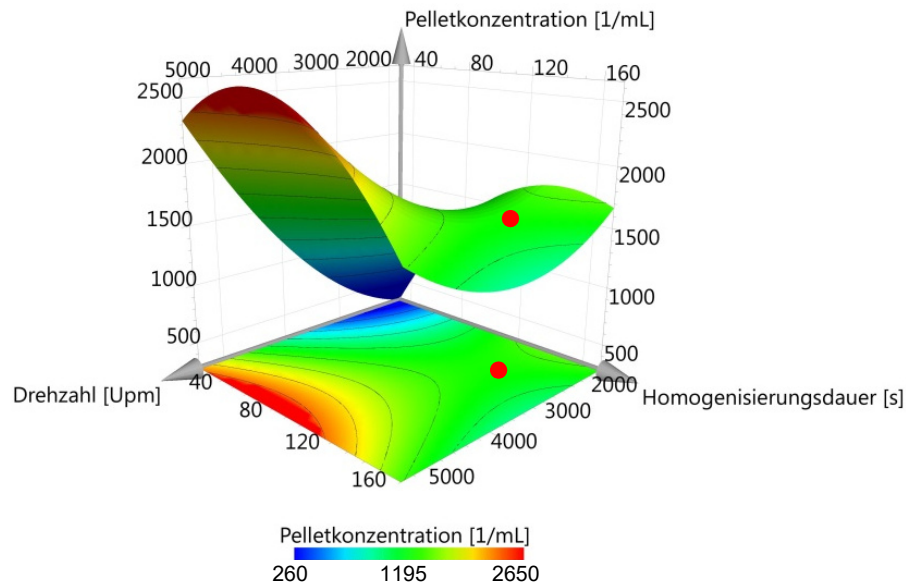
### *Zweite Vorkultur*

Für die Kultivierung in zweiter Vorkultur wurde ebenfalls die Beeinflussung der Morphologie durch die Homogenisierung getestet. Kultivierungen in zweiter Vorkultur wurden mit homogenisierter Kultursuspension variablen Volumens aus der ersten Vorkultur beimpft. Dabei wurde das Volumen so eingestellt, dass die Konzentration der Biotrockenmasse bei 0,25 g/L lag. Ohne diese Abschätzung, bei Einsatz eines festen bzw. konstanten Volumens, entstanden deutlich weniger verlässliche Modelle und der Einfluss der Homogenisierungsparameter konnte nicht genau abgeschätzt werden. Dies zeigte der Vergleich von erfassbarer Varianz und Vorhersagegüte zwischen der Durchführung der Homogenisierungsversuche einmal ohne Einstellung der Biotrockenmassekonzentration zu Kultivierungsbeginn (Beimpfen mit konstantem Volumen homogenisierter Kultursuspension) und mit Einstellung der Biotrockenmassekonzentration zu Kultivierungsbeginn (Beimpfen mit variablem Volumen homogenisierter Kultursuspension) (vgl. Abbildung A.2 mit Abbildung A.12). Um die Auswirkung der Drehzahl im Mischauflauf sowie der Dauer der Homogenisierung auf die Morphologie und weitere Parameter zu bestimmen, wurde wiederum ein CCC-Versuchsplan aufgestellt (siehe Tabelle 2.11). Nachfolgend wird nur die Abhängigkeit der Pelletkonzentration von Drehzahl und Homogenisierungsdauer genauer betrachtet. Die Beschreibung weiterer Parameter in Abhängigkeit der Homogenisierung wird in Kapitel 3.2.4 eingehender beschrieben.

Die multiple lineare Regression lieferte für die gebildete Pelletkonzentration in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter folgende Gleichung:

$$PK = -741,88 + 40,79 \cdot t - 0,14 \cdot n - 3,97 \cdot 10^{-3} \cdot t \cdot n - 0,12 \cdot t^2 + 1,17 \cdot 10^{-4} \cdot n^2 \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Die Werte für die Modellparameter können direkt in die Gleichung eingesetzt werden.

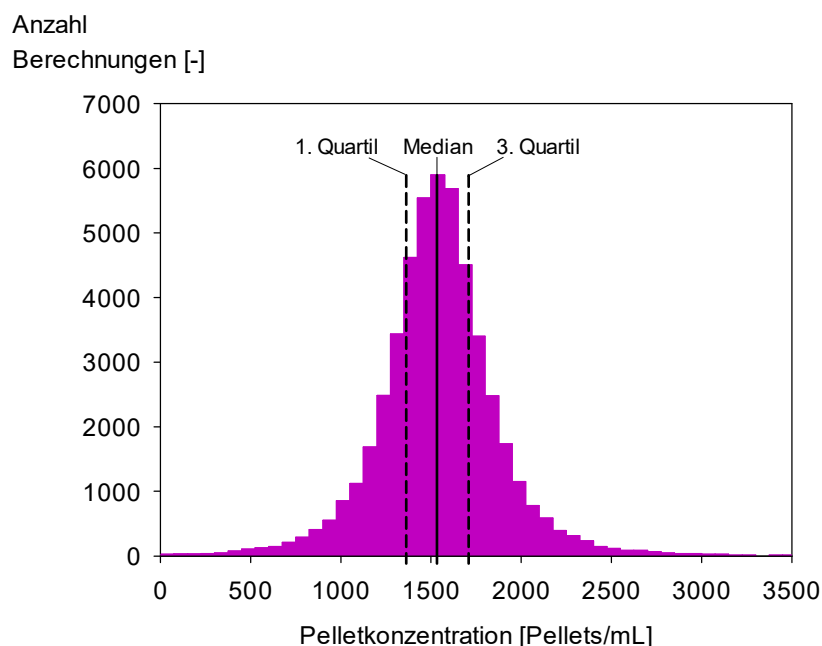


**Abb. 3.5:** Abhängigkeit der Pelletkonzentration von der Homogenisierungsdauer und der Drehzahl in zweiter Vorkultur von *S. commune*. Der rote Punkt kennzeichnet einen Bereich hoher Robustheit gegenüber Veränderungen der Einflussparameter (Drehzahl = 3000 min<sup>-1</sup>, Homogenisierungsdauer  $t = 148$  s).

Die Verteilungsfunktion in Abbildung 3.6 zeigt die Wahrscheinlichkeitsdichte für die Konzentration der Pellets an dem Punkt, an welchem bei einer Veränderung der Homogenisierungsdauer oder der Drehzahl nur eine geringe Veränderung der Pelletkonzentration auftrat. Dieser robuste Betriebspunkt ist in der Abbildung markiert. Das 1. Quartil liegt demnach bei einer Pelletkonzentration von 1360 Pellets/mL. In 25 % der Kultivierungen liegen bei den gewählten Einstellungen somit unter 1360 Pellets/mL vor. In weiteren 25 % der Kultivierungen in zweiter Vorkultur sind mehr als 1707 Pellets/mL vorhanden (2. Quartil). Kultivierungen mit Pelletkonzentrationen unter 1000 Pellets/mL kommen mit einer Wahrscheinlichkeit von 6,3 % vor und Pelletkonzentrationen von mehr als 2000 Pellets/mL können in 4,1 % der Kultivierungen vorkommen.

Es wurde somit ein robuster Punkt gefunden und dieser genau definiert. Für alle Kultivierungen, die nachfolgend bei diesen Einstellungen vorgenommen wurden, um ein reproduzierbares Beimpfen von Reaktorkultivierungen zu ermöglichen, lagen keine Pelletkonzentrationen unter 1000 bzw. über 2000 Pellets/mL vor. Der Mittelwert lag bei knapp 1400 Pellets je Milliliter Kultursuspension und somit nahe dem berechneten Mittelwert von 1537. Die Vorhersagegenauigkeit betrug  $\pm 402$  Pellets/mL ( $\alpha = 0,05$ ).





**Abb. 3.6:** Mittels Monte-Carlo-Simulation berechnete Verteilung der Pelletkonzentration auf Grundlage des berechneten Modells (vgl. Gl. 3.3) bei einer Homogenisierungsdauer von 148 Sekunden und einer Drehzahl von  $3000 \text{ min}^{-1}$  (siehe Markierung in Abbildung 3.5).

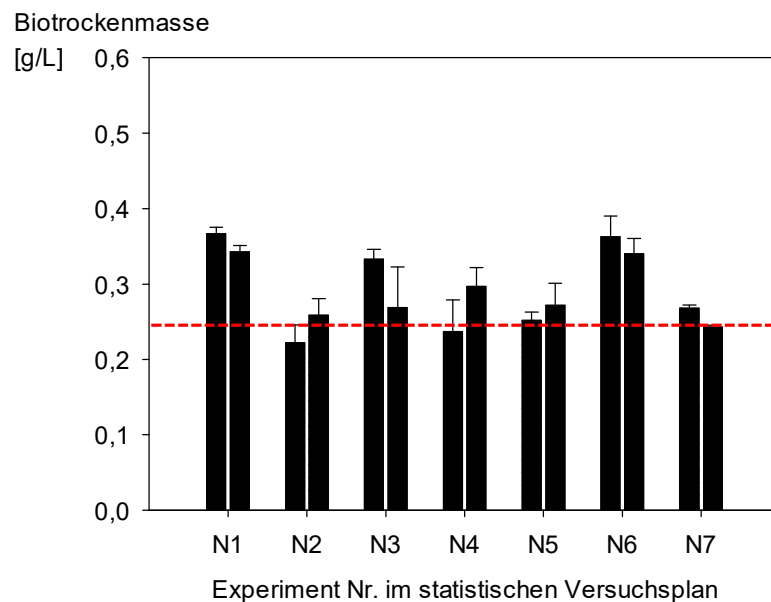
Ebenso wie für Kultivierungen in erster Vorkultur wurde auch bei Kultivierung in zweiter Vorkultur die Konzentration der Biotrockenmasse gegen die jeweils vorliegende Pelletkonzentration aufgetragen. Die Konzentration des Inokulums wurde absichtlich etwas variiert ( $0,1 \text{ g/L} - 0,3 \text{ g/L}$ ), um den Bereich mit unterschiedlichen Pelletkonzentrationen ausreichend auszuweiten, damit auch bei Abweichungen mit Hilfe des hergestellten Zusammenhangs noch eine Abschätzung der Biomasse möglich war. Gleichung 3.4 beschreibt den ermittelten Zusammenhang, der für die Abschätzung der Biomasse in der zweiten Vorkultur genutzt wurde.

$$\text{BTM} = 5,27 \cdot e^{-0,5 \cdot \left( \frac{\text{PK} - 1169,96}{984,71} \right)^2} \quad (R^2 = 0,73) \quad (\text{Gl. 3.4})$$

### *Hauptkultur*

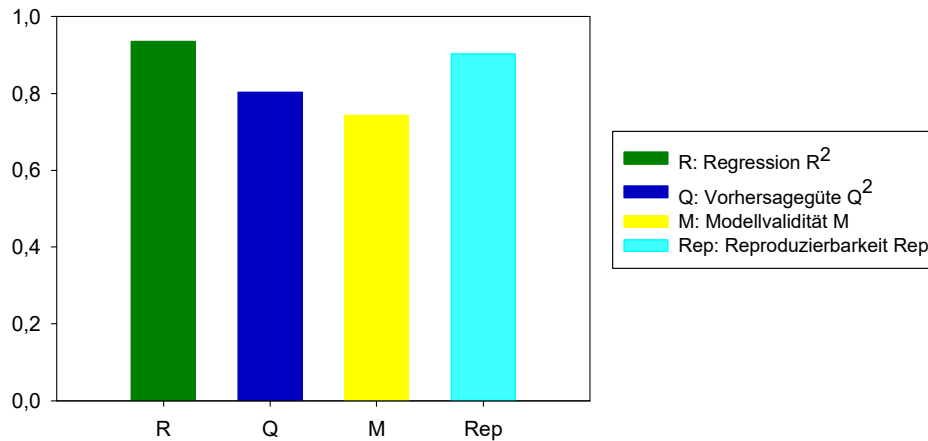
Die Reproduzierbarkeit des Kultivierungsverfahrens wurde abschließend im kleinen Reaktormaßstab (Hauptkultur,  $3 \text{ L}$  Arbeitsvolumen) überprüft. Auch hier wurde die Auswirkung der Homogenisierung von verwendeter Kultursuspension untersucht. Die zentrale Fragestellung war somit, ob valide Modelle mit hoher Vorhersagegüte zur Beschreibung der Morphologie und weiterer Kultivierungsparameter (nachfolgend der Biotrockenmasse) erstellt werden können. Eine gute Reproduzierbarkeit ist hierzu

Voraussetzung. In diesem Fall wurde ein *Full Factorial Design* (FF) verwendet. Der entsprechende Versuchsplan mit den Faktoreinstellungen ist in Tabelle 2.13 aufgeführt. Unter Verwendung von Gleichung 3.4 gelang es die Konzentration der Biotrockenmasse bei Beimpfen der Reaktoren bis auf wenige leichte Abweichungen konstant auf 0,25 g/L einzustellen (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** Konzentration der Biotrockenmasse zu Beginn der Reaktorkultivierung. Die BTM sollte mit Hilfe von Gleichung 3.4 auf eine Konzentration von 0,25 g/L eingestellt werden (---). Jeweils ein Balkenpaar stellt die doppelte Durchführung des Experiments dar (Beispiel N1: Linker Balken N1.1, Rechter Balken N1.2). Die Standardabweichung bezieht sich auf die Abweichung, die sich bei zwei parallel durchgeführten Kultivierungen ergab (Parallel-Kultivierung in zwei Schüttelkolben in der zweiten Vorkultur).

Die Ergebnisse aus der morphologischen Auswertung sowie weitere Ergebnisse der Kultivierung wurden mit den Homogenisierungsparametern mittels multipler linearer Regression korreliert. Dabei wurde auch eine Aussage über die Reproduzierbarkeit getroffen. Abbildung 3.8 zeigt die statistischen Modellparameter für die Konzentration der Biotrockenmasse. Das Modell ermöglichte eine sehr gute Anpassung an die Messwerte und auch die Vorhersagegüte des Modells war sehr gut. Zudem lag die Reproduzierbarkeit mit einem Wert von 0,90 sehr hoch (ein Wert von eins bedeutet maximale Reproduzierbarkeit).



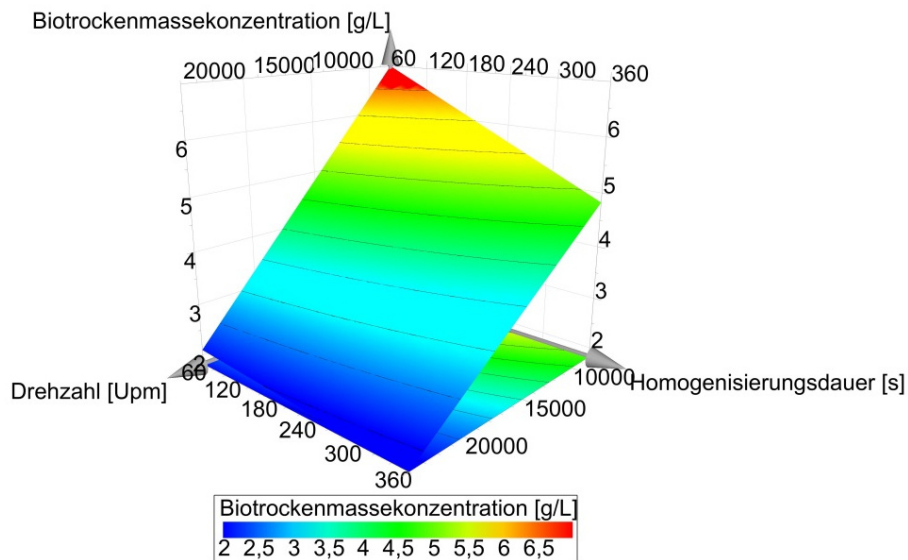
**Abb. 3.8:** Korrelationskoeffizient für die Variation der Messwerte ( $R^2$ ), Vorhersagegüte ( $Q^2$ ), Modellvalidität (M) und Reproduzierbarkeit (Rep) des mittels MLR ermittelten Modells zur Beschreibung der Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration von der Homogenisierung (vgl. Abb. 3.9). Wie sich die statistischen Größen berechnen, ist in Kapitel 2.4.1 im Material- und Methodenteil dargestellt.

Mit Hilfe des Verfahrens konnte ein Modell zur reproduzierbaren Beschreibung der Biomassekonzentration von *S. commune* in Abhängigkeit von Homogenisierungsparametern gefunden werden.

Wie die Homogenisierung die Konzentration der Biotrockenmasse beeinflusst, wird durch Gleichung 3.5 ausgedrückt und ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

$$BTM = 9,97 - 1,01 \cdot 10^{-2} \cdot t - 3,26 \cdot 10^{-4} \cdot n - 3,81 \cdot 10^{-7} \cdot t \cdot n \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Die höchsten Konzentrationen wurden bei nicht intensiver Homogenisierung erhalten. Bei einer Homogenisierungsdauer von 60 Sekunden und einer Drehzahl von 10.000  $\text{min}^{-1}$  wurden Biotrockenmassekonzentrationen von über 6 g/L erreicht. Die Dauer der Homogenisierung wirkte sich nur wenig auf die Konzentration der Biotrockenmasse aus. Den größten, wenn auch zur Drehzahl vergleichsweise geringen Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration, hatte die Homogenisierungsdauer bei geringen Drehzahlen des Ultra-Turrax. Bei hohen Drehzahlen bestand kaum ein Einfluss.



**Abb. 3.9:** Konzentration der Biotrockenmasse, die sich nach 72-stündiger Kultivierung im 3L-Reaktormaßstab ergab, in Abhängigkeit vorangeschalteter Homogenisierung von Kultursuspension aus zweiter Vorkultur bei verschiedenen Drehzahlen und Homogenisierungsdauern mit einem Ultra-Turrax Stab T25. Homogenisierungsparameter aus FF-Design siehe Versuchsdesignplan (Tab. 2.13) im Material- und Methodenteil.

Die während der Homogenisierung eingestellte Drehzahl wirkte sich hingegen deutlich stärker auf die Biomasse aus. So verringerte sich die Konzentration der Biotrockenmasse in der Kultivierung bei Drehzahlerhöhung insbesondere bei kurzer Homogenisierung in dem untersuchten Bereich sehr stark. Wurden bei  $8.000 \text{ min}^{-1}$  noch  $6,9 \text{ g/L}$  gefunden (bei Homogenisierung für  $60 \text{ s}$ ), so waren bei einer Drehzahl von  $24.000 \text{ min}^{-1}$  nur noch  $2,2 \text{ g/L}$  Biotrockenmasse vorhanden. Eine eingehendere Betrachtung für die Abhängigkeiten weiterer Parameter von der Homogenisierung wird in Kapitel 3.2.4 vorgenommen.

Die nachfolgende Tabelle fasst die Parametereinstellungen für eine maximal reproduzierbare Kultivierungsführung von *S. commune* zusammen. Die Tabelle gibt zusätzlich die unter diesen Bedingungen erzeugten morphologischen Parameter an, deren Analyse zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit besonders wichtig ist.

**Tab. 3.1:** Parametereinstellungen für eine maximal reproduzierbare Kultivierungsführung von *S. commune* und sich ergebende morphologische Parameter projizierte Pelletfläche (PPF) und Pelletkonzentration (PK) mit zugehöriger Standardabweichung.

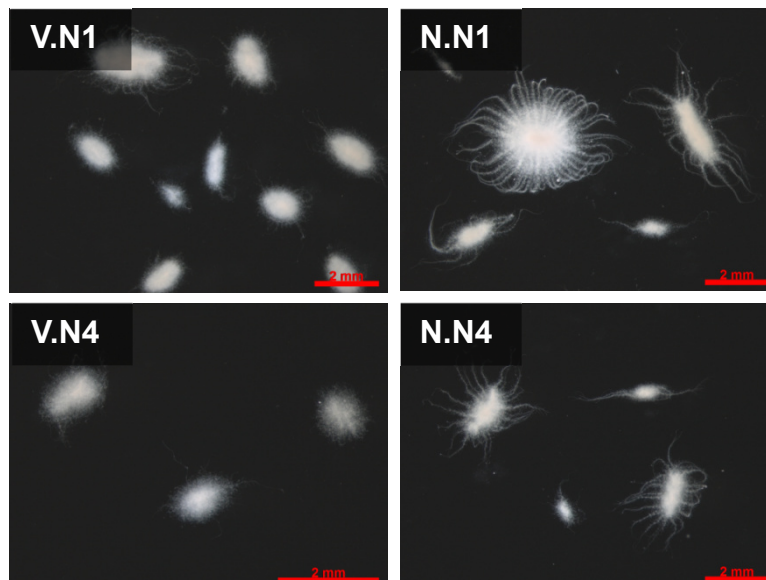
	Inokulumkonzentration	Homogenisierung	Morphologie	Vorteile
1	7,85 cm <sup>2</sup> Luftmycel / L	4000 Upm 180 s (U. Turrax Tube Drive)	PPF 4,04 ± 0,77 PK 59 ± 19	- Robustheit - BTM kann abgeschätzt werden - BTM-Bildung nicht limitiert
2	0,25 g/L Biotrockenmasse	3000 Upm 148 s (U. Turrax Tube Drive)	PPF 0,99 ± 0,25 PK 1537 ± 402	- Robustheit - maximale BTM ermöglicht kleine Vorfermenter und verkürzte Vorkultivierung
3	0,25 g/L Biotrockenmasse	Für max. RZA (1,9 g/(Ld)) 8000 Upm 360 s (U. Turrax T 18)	PPF 0,51 ± 0,10 PK 1527 ± 533	Optimierungen unter reproduzierbaren Bedingungen möglich

Mit Hilfe der Morphologieanalyse konnten Abweichungen frühzeitig detektiert werden. Das folgende Beispiel in Tabelle 3.2 zeigt morphologische Veränderungen aufgrund einer spontanen Stammmutation. Aufgrund der veränderten Beziehung zwischen Pelletkonzentration und Konzentration der Biotrockenmasse (Daten nicht gezeigt) konnte die zu erzielende Biotrockenmassekonzentration von 0,25 g/L bei Beginn der Kultivierung in zweiter Vorkultur nicht eingestellt werden, sodass auch dort die Morphologie der gebildeten Pellets deutlich von den geforderten Einstellungen der morphologischen Parameter zur reproduzierbaren Kultivierungsführung divergierte. Die Kultivierung in der Hauptkultur konnte daher nicht reproduzierbar durchgeführt werden.

**Tab. 3.2:** Vergleich der Morphologie von *S. commune* unter reproduzierbaren Bedingungen (soll) mit der Morphologie bei einer spontan aufgetretenen Stammveränderung (ist) unter Angabe des dadurch falsch eingestellten Reproduzierbarkeitskriteriums der Inokulumkonzentration (ist) im Vergleich mit der für optimale Reproduzierbarkeit einzustellenden Inokulumkonzentration (soll).

	Inokulumkonzentration (soll)	Morphologie (soll)	Inokulumkonzentration (ist)	Morphologie (ist)
1. Vorkultur	7,85 cm <sup>2</sup> Luftmycel / L	PPF 4,04 ± 0,77	7,85 cm <sup>2</sup> Luftmycel / L	PPF 5,92 ± 0,46
		PK 59 ± 19		PK 95 ± 3
		R 0,78 ± 0,01		R 0,66 ± 0,00
2. Vorkultur	0,25 g/L Biotrockenmasse	PPF 0,99 ± 0,25	0,15 ± 0,01 g/L Biotrockenmasse	PPF 2,96 ± 0,19
		PK 1537 ± 402		PK 664 ± 2
		R 0,81 ± 0,01		R 0,56 ± 0,03
Hauptkultur	0,25 g/L Biotrockenmasse		0,33 ± 0,04 g/L Biotrockenmasse	

Exemplarisch werden in Abbildung 3.10 Pellets aus der zweiten Vorkultur verglichen, die vor sowie nach der Veränderung des Stammes, mikroskopiert wurden.



**Abb. 3.10:** Pellets von *S. commune* in zweiter Vorkultur. V: Vor Stammveränderung. N: Nach spontan aufgetretener Stammveränderung. N1: Homogenisierung beim Überimpfen mit 2370 Upm für 50 s im Mischaufrührer DT-50-M gamma. N4: Homogenisierung beim Überimpfen mit 5370 Upm für 150 s.

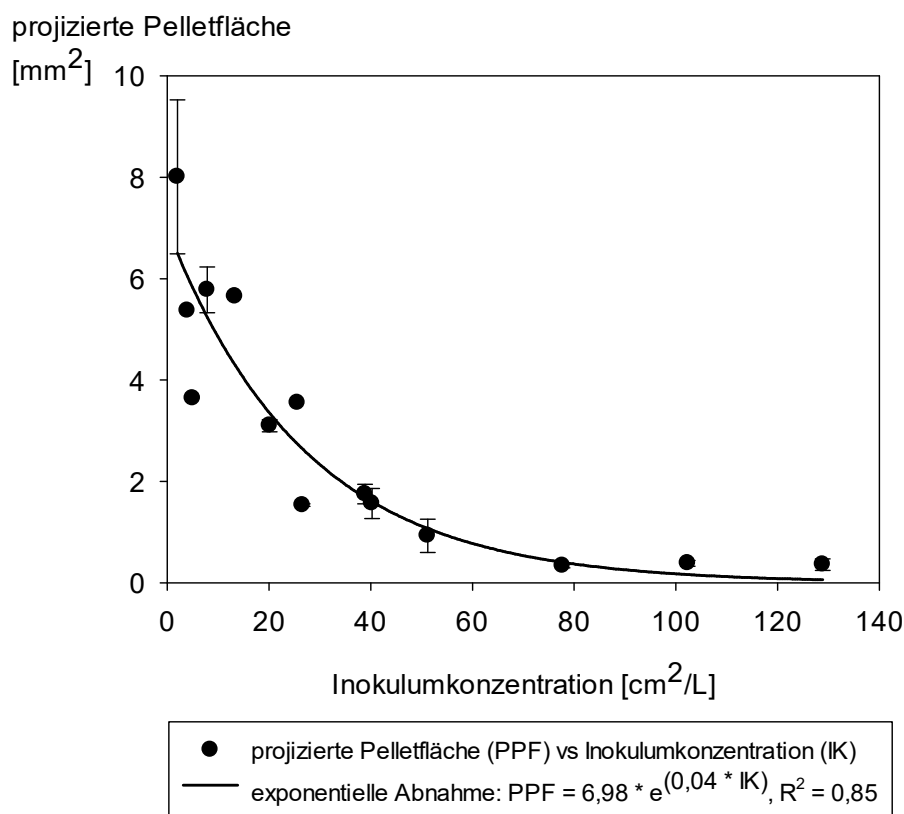
## 3.2 Morphologiebeeinflussung

### 3.2.1 Morphologie in Abhängigkeit der Inokulumkonzentration

Variationen in der zu Kultivierungsbeginn eingesetzten Biotrockenmassekonzentration zeigten deutliche Auswirkungen auf die Pilzmorphologie. Zusätzlich sind Zusammenhänge mit weiteren Parametern wie der gebildeten Biotrockenmasse und der Raum-Zeit-Ausbeute dargestellt. Diese Größen wurden eingehend auf Zusammenhänge mit der durch Variation der Inokulumkonzentration variierten Morphologie untersucht.

#### 3.2.1.1 Beimpfen mit Luftmycel

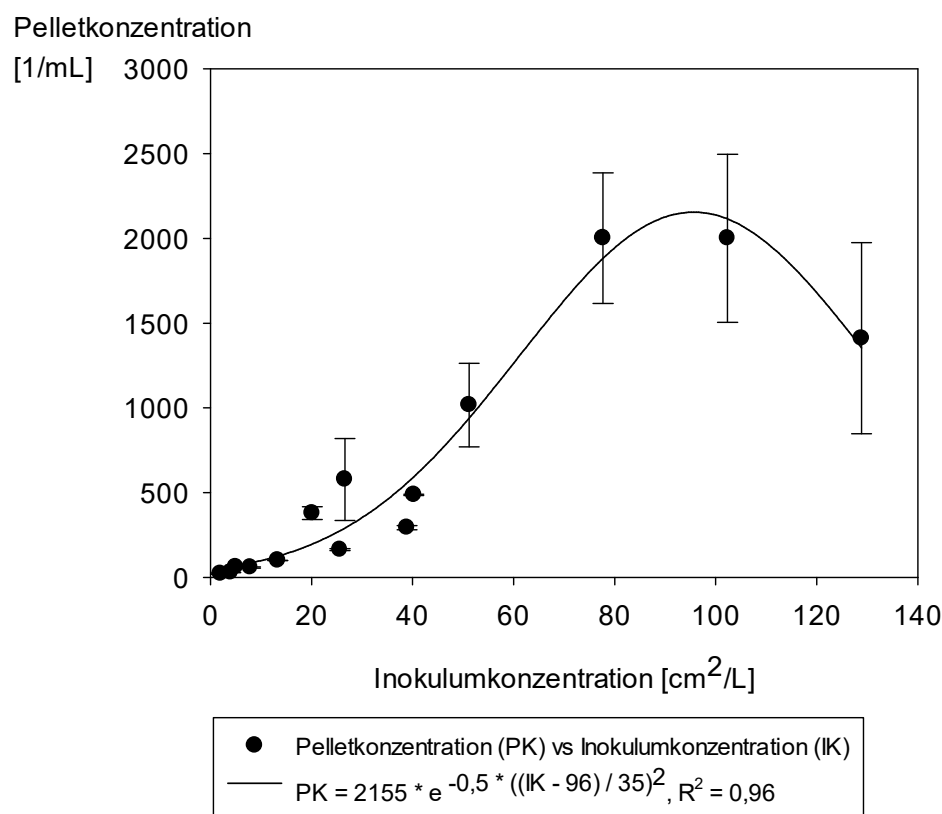
Je mehr Luftmycel in der ersten Vorkultur zum Beimpfen eingesetzt wurde, desto kleinere Pellets wurden gebildet (Abb. 3.11). Es ergab sich eine exponentielle Abnahme der projizierten Pelletfläche.



**Abb. 3.11:** Einfluss der Inokulumkonzentration von Luftmycel, angegeben als mit Luftmycel bewachsene Agarfläche, auf die gebildete projizierte Pelletfläche von *S. commune*.

Bei der geringsten Inokulumkonzentration betrug die projizierte Pelletfläche etwa 8 mm<sup>2</sup>. Bei einer Inokulumkonzentration von fast 130 cm<sup>2</sup> je Liter Medium (dies

entspricht etwa 1/5 einer verwendeten Agarplatte im Schüttelkolben mit 100 mL Medium) wurde eine projizierte Pelletfläche von 0,25 mm<sup>2</sup> erreicht. Die geringste Pelletfläche in der zweiten Vorkultur betrug 0,16 mm<sup>2</sup> (vgl. Abb. 3.16.a). Es konnte somit erreicht werden, dass bereits in der ersten Vorkultur sehr kleine Pellets ausgebildet werden. Jedoch lag eine inhomogenere Pelletgrößenverteilung vor. Während die Homogenität in der ersten Vorkultur  $0,43 \pm 0,07$  betrug, wurde in der zweiten Vorkultur mit 0,67 eine etwas höhere Homogenität erzielt. Unterschiede in der Homogenität zeigten sich noch deutlicher bei einem Vergleich von etwa 1 mm<sup>2</sup> großen Pellets. Mit einem Homogenitätswert von  $0,48 \pm 0,06$  lagen in der ersten Vorkultur sehr unterschiedlich große Pellets vor, in der zweiten Vorkultur wurden hingegen nicht so unterschiedlich große Pellets gebildet (Homogenität der Pelletgrößenverteilung bei 0,82).



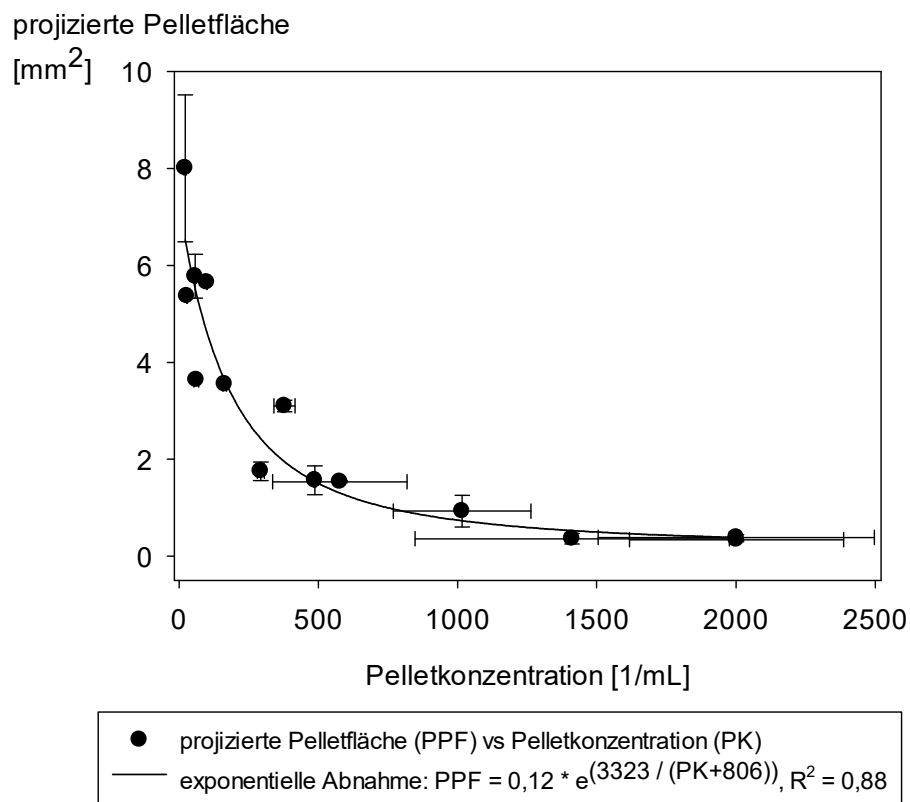
**Abb. 3.12:** Pelletkonzentration von *S. commune* in Abhängigkeit der Inokulumkonzentration von Luftmycel, angegeben als mit Luftmycel bewachsene Agarfläche.

Die Pelletkonzentration nahm mit Erhöhung der Inokulumkonzentration zunächst exponentiell zu, erreichte bei sehr hohen Konzentrationen an eingesetztem Luftmycel ein Maximum und schien dann wieder leicht abzusinken bzw. im Bereich des Maximums bei einer Konzentration von etwa 2000 Pellets je Milliliter zu stagnieren



(hohe Standardabweichung lässt keine genaue Aussage zu). Es fällt auf, dass das exponentielle Absinken der projizierten Pelletfläche mit einer im Gegenzug exponentiell zunehmenden Pelletkonzentration verknüpft war. Stagnierte die projizierte Pelletfläche bei hohen Inokulumkonzentrationen, so veränderte sich auch die Pelletkonzentration in diesem Bereich nicht.

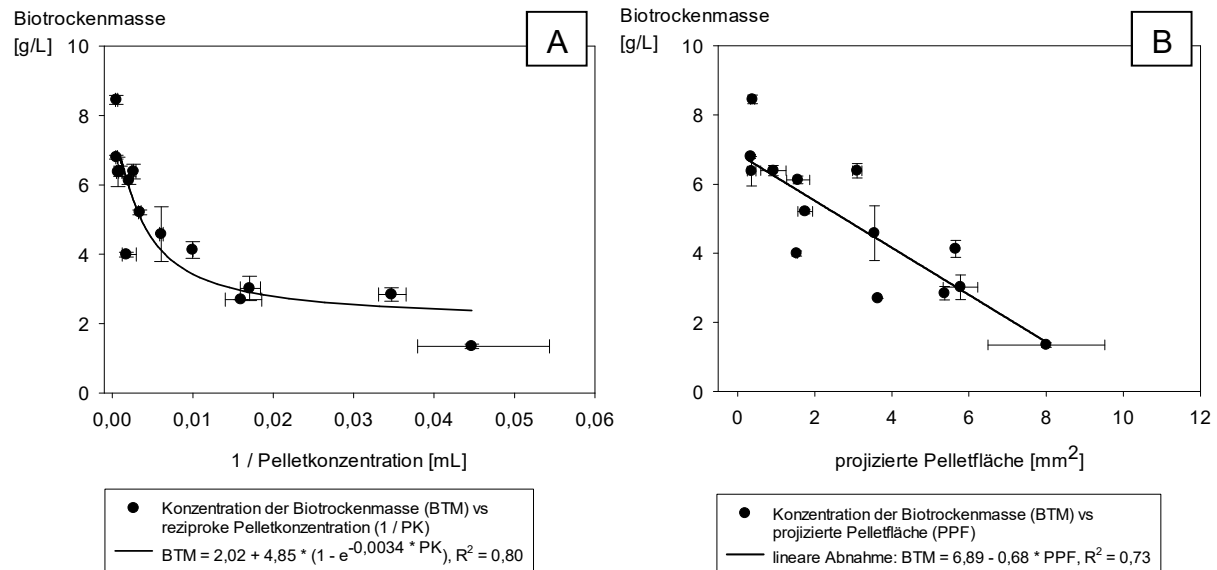
Abbildung 3.13 zeigt den direkten Zusammenhang von projizierter Pelletfläche und vorliegender Pelletkonzentration. Mit zunehmender Konzentration der Pellets wurden die Pellets deutlich kleiner. Lagen etwa 22 Pellets je Milliliter Kultursuspension vor, so wurden Pellets einer Größe von 8 mm<sup>2</sup> gebildet. Bei einer Konzentration von 2000 Pellets/mL betrug die gebildete Pelletfläche nur noch knapp 0,3 mm<sup>2</sup>.



**Abb. 3.13:** Projizierte Pelletfläche von *S. commune* in Abhängigkeit der vorliegenden Pelletkonzentration. Beimpfen der Kultivierungen erfolgte ausgehend von verschiedenen Konzentrationen an Luftmycel.

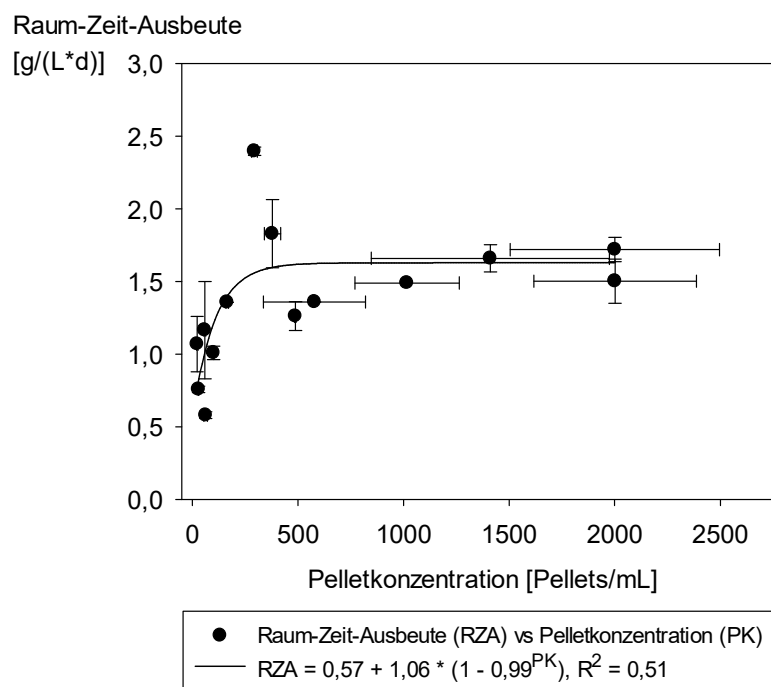
Wurden große Pellets und entsprechend nur wenige Pellets ausgebildet, so war die Konzentration der Biotrockenmasse gering (Abb. 3.14). Je kleiner die Pellets waren und umso mehr Pellets gebildet wurden, umso höher fiel die Konzentration der Biomasse aus. Zusammenhänge von Pelletkonzentration und projizierter Pelletfläche,

die ausgenutzt wurden, um die Konzentration der Biotrockenmasse quantitativ zu beschreiben sind im Detail in Kapitel 3.4.3 dargestellt.



**Abb. 3.14:** Konzentration der Biotrockenmasse in Abhängigkeit der Pelletkonzentration (reziprok) (A) und der projizierten Pelletfläche (B). Die Kultivierungen wurden von verschiedenen Luftmycelkonzentrationen ausgehend beimpft. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der auf der y-Achse und auf der x-Achse dargestellten Messwerte an.

Die Raum-Zeit-Ausbeute stieg im Pelletkonzentrationsbereich von etwa 30 bis 165 Pellets je Milliliter deutlich von etwa 0,5 auf knapp 1,5 g/(Ld) an (Abb. 3.15).

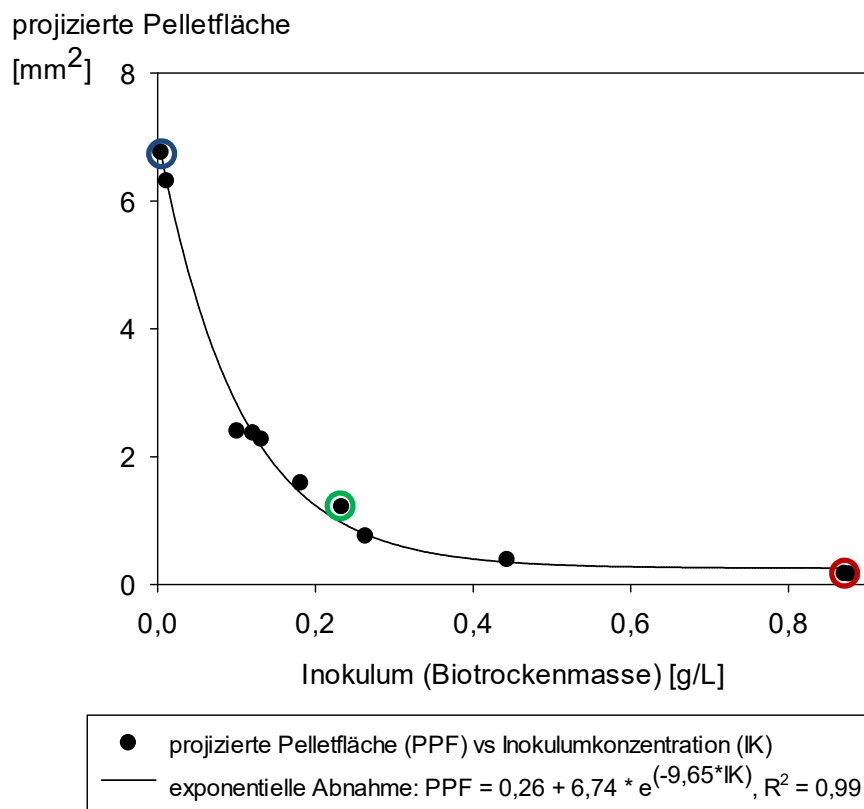


**Abb. 3.15:** Raum-Zeit-Ausbeute für in erster Vorkultur gebildetes Polysaccharid in Abhängigkeit der Pelletkonzentration. Zur Ermittlung der Raum-Zeit-Ausbeute wurde der Zeitraum von 0 bis 72 h der Kultivierung betrachtet.

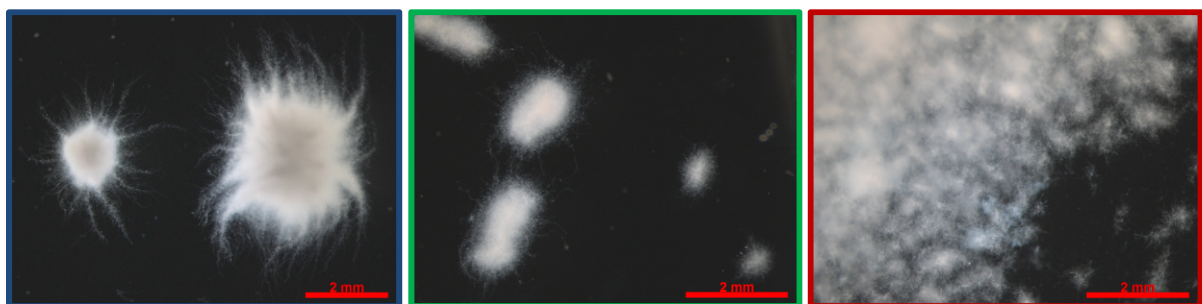
Im Bereich bis etwa 500 Pellets/mL zeigten sich starke Schwankungen für die Raum-Zeit-Ausbeute. Bei Pelletkonzentrationen über 500 Pellets/mL schwankte die Raum-Zeit-Ausbeute nur leicht um einen Wert von ca. 1,5 g/(L·d). Diese Raum-Zeit-Ausbeute wurde bei hohen Pelletkonzentrationen, bei denen gleichzeitig sehr kleine Pellets mit einer projizierten Pelletfläche von weniger als 1 mm<sup>2</sup> vorlagen, erreicht (vgl. Abb. 3.11).

### 3.2.1.2 Beimpfen mit Kultursuspension

Die Pelletgröße nahm, wie auch in der ersten Vorkultur beobachtet, mit zunehmender Inokulumkonzentration exponentiell ab. Lag bei Beimpfen der Kultivierung eine sehr geringe Inokulumkonzentration vor (0,004 – 0,01 g/L), so wurden Pellets mit einer projizierten Pelletfläche von über 6 mm<sup>2</sup> gebildet. Sehr kleine Pellets mit einer projizierten Pelletfläche von nur 0,16 mm<sup>2</sup> entstanden hingegen bei einer Konzentration an Biotrockenmasse von etwa 0,9 g/L.

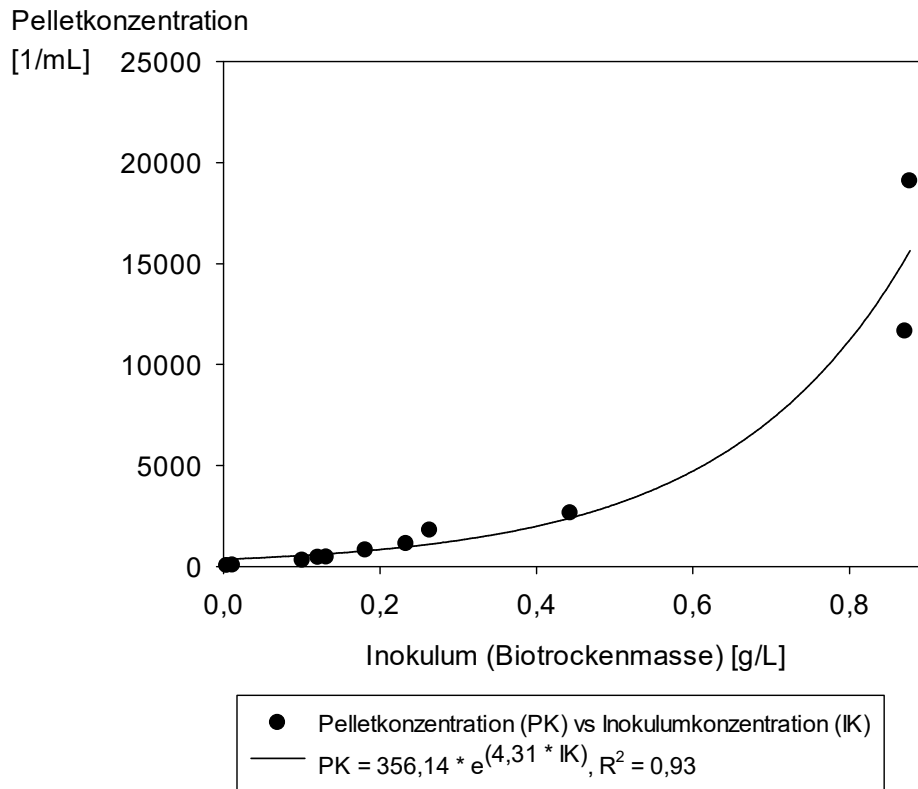


**Abb. 3.16.a:** Einfluss der Inokulumkonzentration, angegeben als Biotrockenmasse homogenisierter Kultursuspension, auf die gebildete projizierte Pelletfläche von *S. commune*. Für die eingekreisten Werte sind Bilder der entsprechenden Proben in Abbildungsteil b dargestellt.



**Abb. 3.16.b:** Mikroskopische Aufnahmen zu den in Abbildungsteil a hervorgehobenen Werten. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 mm.

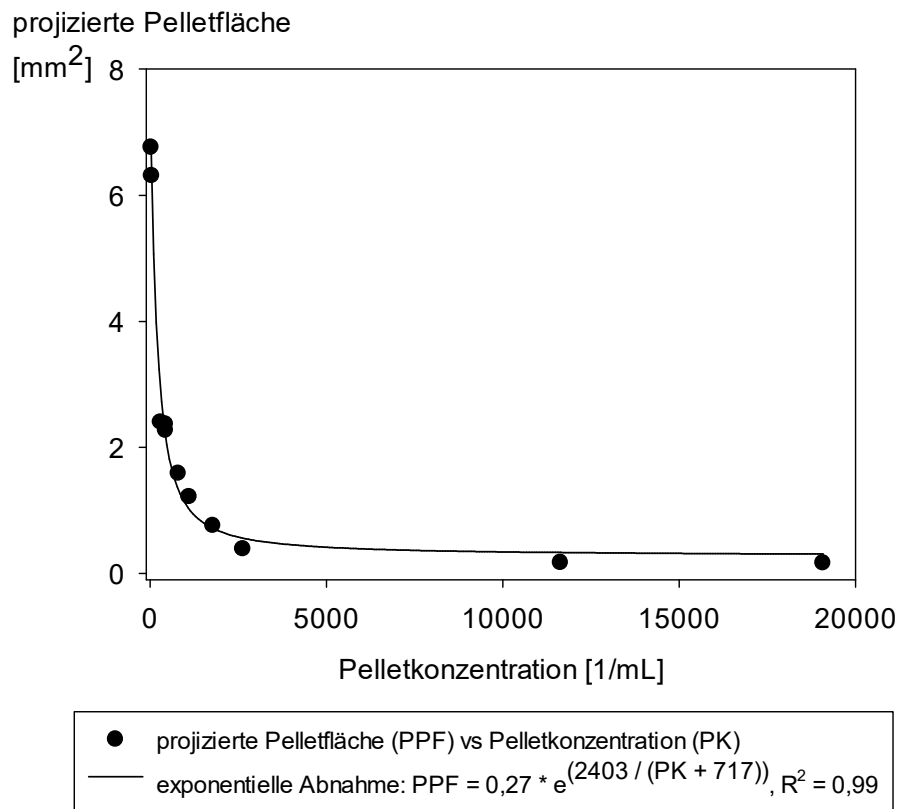
Es handelte sich, wie in Abbildung 3.16.b zu erkennen, auch bei hohen Inokulumkonzentrationen immer noch um Pellets.



**Abb. 3.17:** Pelletkonzentration von *S. commune* in Abhängigkeit der Inokulumkonzentration, angegeben als Biotrockenmasse homogenisierter Kultursuspension.

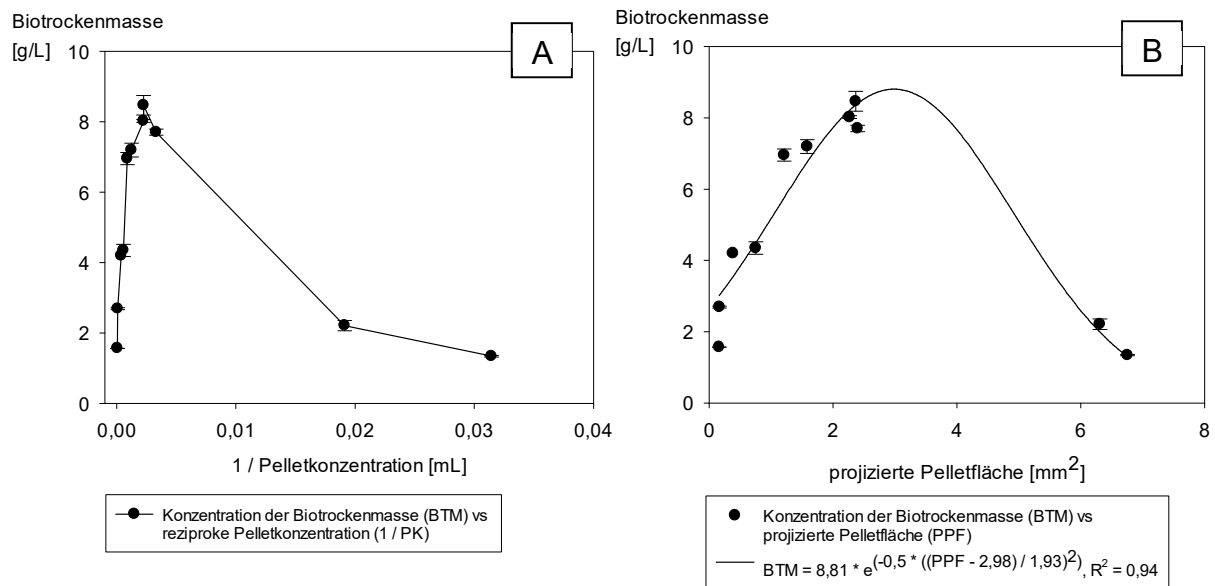
Die Pelletkonzentration stieg mit der zu Kultivierungsbeginn vorliegenden Menge an Biomasse exponentiell an. Bei einer Konzentration von in etwa 0,9 g/L wurden zum Teil fast 20.000 Pellets je Milliliter Kultursuspension gebildet (Abb. 3.17). Hingegen lagen bei den geringsten Konzentrationen nur zwischen 30 und 50 Pellets vor.

Somit konnte die Inokulumkonzentration von homogenisiertem Mycel genutzt werden, um zu beeinflussen wie viele Pellets *S. commune* ausbildet. Damit zusammenhängend veränderte sich automatisch auch die Größe der Pellets (Abb. 3.18). Der festgestellte Zusammenhang ähnelte sehr dem in erster Vorkultur.



**Abb. 3.18:** Projizierte Pelletfläche von *S. commune* in Abhängigkeit der vorliegenden Pelletkonzentration in zweiter Vorkultur.

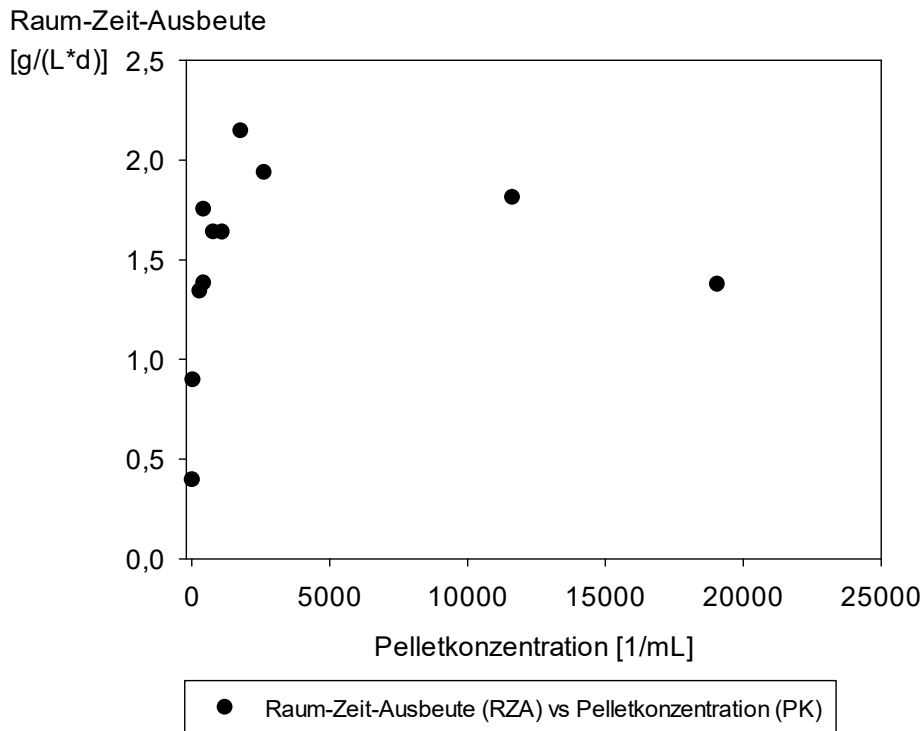
Mit zunehmender Pelletgröße nahm die Konzentration der Biotrockenmasse zunächst zu (Abb. 3.19). Es lag im Gegensatz zur ersten Vorkultur, in der eine lineare Abnahme zu verzeichnen war, ein linearer Anstieg vor. Wurden sehr große Pellets und entsprechend nur wenige Pellets ausgebildet, so war die Konzentration der Biotrockenmasse gering. Die entsprechenden Werte waren in etwa vergleichbar zu denen in der ersten Vorkultur bei ähnlichen Pelletgrößen. Es wurde somit ein Maximum von etwa 8 g/L bei einer projizierten Pelletfläche von 3 mm<sup>2</sup> durchlaufen.



**Abb. 3.19:** Konzentration der Biotrockenmasse in Abhängigkeit der Pelletkonzentration (reziprok) (A) und der projizierten Pelletfläche (B). Die Kultivierungen wurden ausgehend von homogenisierter Kultursuspension aus erster Vorkultur mit verschiedenen Inokulumkonzentrationen gestartet. Dargestellt sind die Ergebnisse von Einzelkultivierungen.

Aufgrund der eindeutigen Korrelation zwischen Pelletgröße und Pelletanzahl (vgl. Abb. 3.18) wurde auch für die Abhängigkeit der Biotrockenmasse von der Pelletkonzentration ein Maximum durchlaufen. Dies lag bei einer Pelletkonzentration von etwa 400 Pellets/mL vor. Wesentliche Kernaussage ist, dass mit Bildung kleiner zahlreicher Pellets, die Konzentration der Biomasse geringer ausfiel.

Die Betrachtung der Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration von der Pelletkonzentration wurde im Kapitel 3.1, in der die Entwicklung eines mittels morphologischer Analyse reproduzierbaren Kultivierungsverfahrens im Fokus steht, im Detail vorgenommen. Im Bereich geringer Pelletkonzentrationen kann zum Beispiel die lineare Abhängigkeit, die sich dort zwischen Biotrockenmasse und Pelletkonzentration ergab, genutzt werden, um die BTM mit Hilfe der Pelletkonzentration abzuschätzen. Dies war notwendig um die Konzentration bei Start der Kultivierung konstant zu halten. Ein Zusammenhang von Biotrockenmassekonzentration und Pelletkonzentration konnte in ähnlicher Weise auch für die zweite Vorkultur genutzt werden.



**Abb. 3.20:** Raum-Zeit-Ausbeute für in zweiter Vorkultur gebildetes Polysaccharid in Abhängigkeit der Pelletkonzentration. Zur Ermittlung der Raum-Zeit-Ausbeute wurde der Zeitraum von 0 bis 72 h der Kultivierung betrachtet.

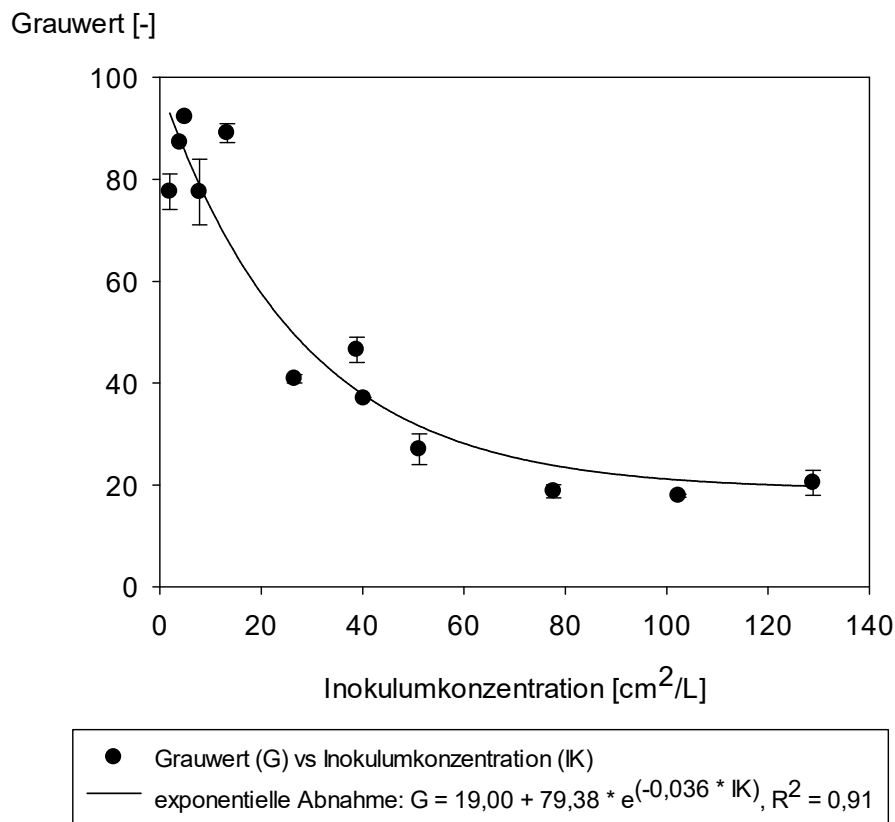
Die Raum-Zeit-Ausbeute entwickelte sich ähnlich wie in der ersten Vorkultur. Im Bereich sehr geringer Pelletkonzentrationen stieg sie zunächst bei nur geringfügiger Zunahme der Pelletkonzentration stark an. Sie erreichte im Bereich von etwa 2000 Pellets/mL ein Maximum von knapp 2 g/(Ld). Damit lag sie in diesem Bereich etwas über der Raum-Zeit-Ausbeute in der ersten Vorkultur. Dort betrug sie bei vergleichbaren Pelletkonzentrationen nur etwa 1,5 g/(Ld). Konnten mit Hilfe sehr hoher Inokulumkonzentrationen außerordentlich hohe Pelletkonzentrationen erzeugt werden, so sank die Raum-Zeit-Ausbeute wieder etwas ab. Bei einer Pelletkonzentration von knapp 20.000 Pellets/mL wurde noch eine Raum-Zeit-Ausbeute von etwa 1,5 g/(Ld) erreicht. Eine zusätzliche Beobachtung war, dass bei den sehr hohen Pelletkonzentrationen kurz vor Beendigung der Kultivierung (72 h) fast keine Durchmischung mehr auftrat und die oberste Schicht der Kultursuspension bereits Luftmycel zu bilden begann. Da die Polysaccharidkonzentration jedoch geringer war als bei einer Pelletkonzentration von 2000 Pellets/mL und auch die Biotrockenmassekonzentration deutlich darunter lag (etwa 2 anstatt bis zu 8 g/L), musste die augenscheinlich deutlich höhere Viskosität in der vorliegenden Morphologie (sehr kleine Pellets) begründet sein. Ob eine Erhöhung der Schüttelfrequenz und die damit verbundene verbesserte Durchmischung jedoch zu



einer Steigerung der Produktivität und des Ertrages führen, wird in Kapitel 3.2.2 näher betrachtet. Die Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit der projizierten Pelletfläche und zugehörige mikroskopische Aufnahme bei der höchsten Raum-Zeit-Ausbeute sind im Anhang in Abbildung A.3 dargestellt.

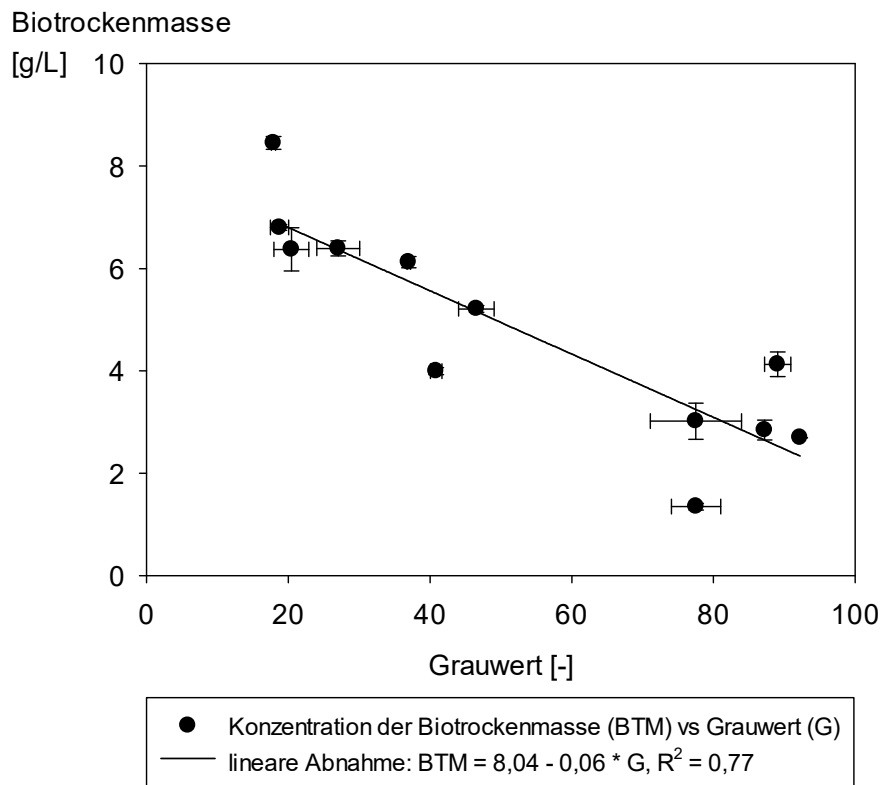
### 3.2.1.3 Grauwert und Pelletdichte in Abhängigkeit der Inokulumkonzentration

Durch Variation der Inokulumkonzentration veränderte sich der Grauwert. Der Zusammenhang zwischen dem Grauwert und der Pelletdichte wurde zusätzlich untersucht.



**Abb. 3.21:** Korrelation von Grauwert und Inokulumkonzentration. Inokulumkonzentration von Luftmycel, angegeben als mit Luftmycel bewachsene Agarfläche.

Mit zunehmender Konzentration des Inokulums nahm der Grauwert exponentiell ab. Welcher Zusammenhang zwischen dem Grauwert und der pelletbezogenen Biomassedichte besteht, wird nachfolgend näher betrachtet.

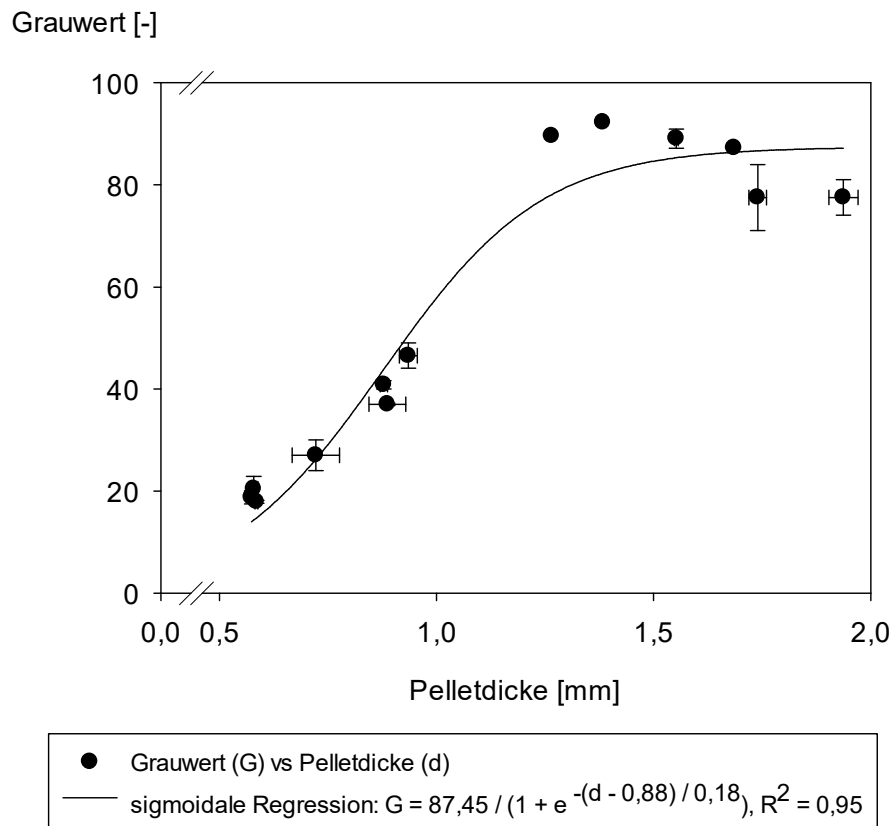


**Abb. 3.22:** Konzentration der Biotrockenmasse in Abhängigkeit des Grauwerts. Inokulation erfolgte mit unterschiedlichen Luftmycelkonzentrationen (siehe Abbildung 3.21).

Zwischen der Konzentration der Biotrockenmasse und dem Grauwert der Pellets ergab sich ein linearer Zusammenhang. Ein hoher Grauwert korrelierte mit niedrigen Biomassen in der Kultursuspension. Hohe Grauwerte traten auf, wenn große Pellet gebildet wurden (Abb. 3.22).

Wurde die pelletvolumen-spezifische Biomassedichte mit dem Grauwert korreliert, so konnte keine Abhängigkeit gefunden werden. Der Grauwert konnte somit nicht genutzt werden, um die Dichte der Pellets anzugeben. Jedoch zeigte sich bei der Korrelation des Grauwerts mit der Pelletdicke, dass mit zunehmender Dicke der Pellets zunächst eine nahezu lineare Zunahme des Grauwerts beobachtet werden konnte. Ab einer Pelletdicke von mehr als 1,2 mm nahm der Grauwert nicht mehr weiter zu. Dies liegt vermutlich daran, dass gegenläufige Effekte bei großen Pellets zunahmen, wie zum Beispiel Schattenwurf in die Mitte der Pellets. Zudem bestand allgemein ein Sättigungseffekt. D.h. dicke Pellets waren in vielen Bereichen gar nicht mehr für das Licht durchlässig und somit war der maximale Grauwert in diesen Bereichen erreicht. Eine Korrelation mit der pelletspezifischen Biomassedichte konnte somit nicht bei hohen Grauwerten (und somit für große Pellets) erfolgen, da der Grauwert sich hier

aufgrund der Pelletdicke nicht mehr veränderte. Der Grauwert konnte jedoch vielmehr zur Abschätzung der Pelletdicke bei kleinen Pellets verwendet werden.



**Abb. 3.23:** Grauwert als Funktion der Pelletdicke. Kultivierungen in erster Vorkultur unter Verwendung verschiedener Luftmycelkonzentrationen bei Beimpfen.

Die pelletspezifische Biomassedichte nahm mit zunehmender Pelletgröße (Pelletdicke oder projizierter Pelletfläche) tendenziell linear ab. Pellets von etwa 0,4 mm<sup>2</sup> wiesen eine pelletspezifische Biomassedichte von etwa 1,7 µg<sub>BTM</sub>/mmP<sup>3</sup> auf. Große Pellets (ca. 8 mm<sup>2</sup>) hatten hingegen nur eine Dichte von etwa 0,5 µg<sub>BTM</sub>/mmP<sup>3</sup>. Da für die berechneten Regressionen von pelletspezifischer Biomassedichte mit der Pelletgröße keine hohen Korrelationskoeffizienten gefunden werden konnten, kann dies jedoch nur als Trend ausgelegt werden. Der Zusammenhang ist eindeutiger, wenn Pellets mit größeren Unterschieden in der pelletspezifischen Biomassedichte verglichen werden (Abb. 3.26, Kap. 3.2.1.4). In der nachfolgenden Tabelle werden pelletspezifische Biomassedichten unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen miteinander verglichen. Für eine Standardkultivierung im Schüttelkolben in erster Vorkultur wurde eine pelletspezifische Dichte der Biomasse von 0,78 ± 0,02 µg<sub>BTM</sub>/mmP<sup>3</sup> gefunden. Mit Erhöhung der Inokulumkonzentration sank sie etwas ab (0,69 ± 0,12 µg<sub>BTM</sub>/mmP<sup>3</sup> bei Inokulumkonzentration von 25,6 cm<sup>2</sup>/L). Bei Erhöhung der Schüttelfrequenz und

Zufüttern von Glucose nach 48 h der Kultivierung wuchsen die Pellets deutlich dichter. Es wurde eine pelletspezifische Biomassedichte von bis zu  $1,20 \pm 0,06 \mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mmP}^3$  erreicht. Dies wird in Kapitel 3.2.2 noch einmal aufgegriffen. Hohe Glucosekonzentrationen führten hingegen dazu, dass Pellets deutlich geringerer Biomassedichte gebildet wurden.

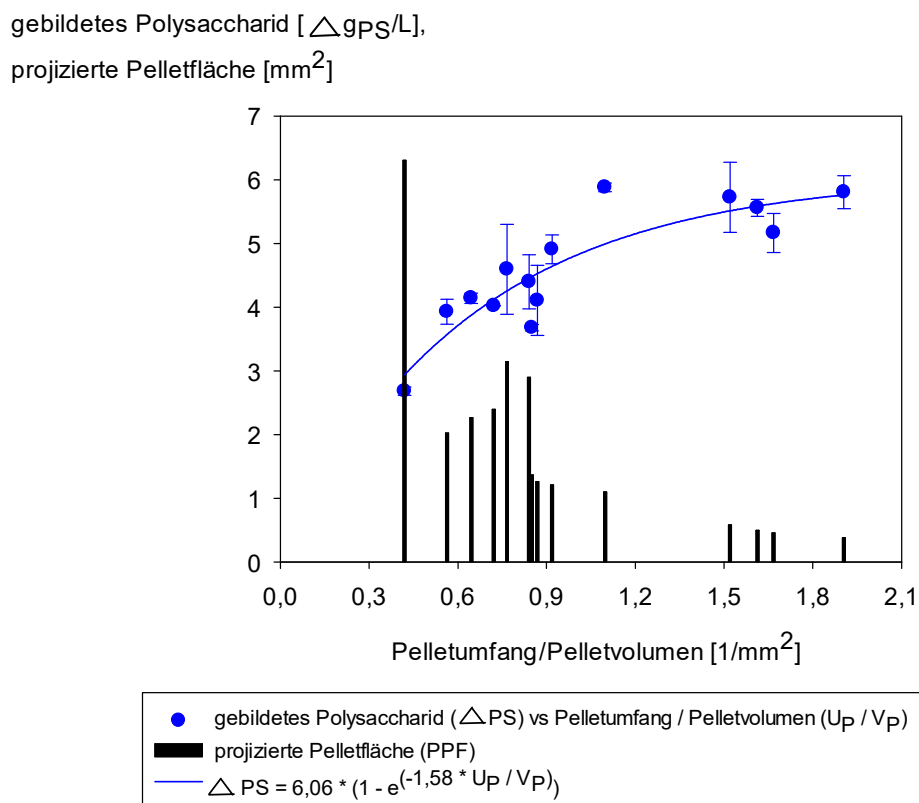
**Tab. 3.3:** Pelletvolumen-spezifische Biomasse (Biomassedichte) unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Kultivierung unter Standardbedingungen (Stb), bei Veränderung der Schüttelfrequenz unter Glucosezugabe und/oder Erhöhung der Inokulumkonzentration sowie in zwei verschiedenen Reaktorkultivierungen.

Kultivierungsbedingungen	Pelletspezifische Biomassedichte [ $\mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mmP}^3$ ]
Erste Vorkultur, Kultivierung unter Standardbedingungen (Stb)	$0,78 \pm 0,02$
Erste Vorkultur unter Stb, jedoch Zugabe von 10 g/L Glucose und Erhöhung der Schüttelfrequenz auf 150 Upm nach 48 h.	$1,16 \pm 0,04$
Erste Vorkultur unter Stb, jedoch erhöhte Inokulumkonzentration von $13,3 \text{ cm}^2/\text{L}$	$0,70 \pm 0,04$
Erste Vorkultur unter Stb, jedoch Zugabe von 10 g/L Glucose und Erhöhung der Schüttelfrequenz auf 150 Upm nach 48 h + erhöhte Inokulumkonzentration von $13,3 \text{ cm}^2/\text{L}$	$1,13 \pm 0,02$
Erste Vorkultur unter Stb, jedoch erhöhte Inokulumkonzentration von $25,6 \text{ cm}^2/\text{L}$	$0,69 \pm 0,12$
Erste Vorkultur unter Stb, jedoch Zugabe von 10 g/L Glucose und Erhöhung der Schüttelfrequenz auf 150 Upm nach 48 h + erhöhte Inokulumkonzentration von $25,6 \text{ cm}^2/\text{L}$	$1,20 \pm 0,06$
Erste Vorkultur Kultivierung unter Stb, jedoch 180 g/L Glucose verwendet	$0,43 \pm 0,00$
Reaktorkultivierung, beimpft mit ganzen Pellets	$0,90 \pm 0,09$
Reaktorkultivierung, beimpft mit homogenisierter Kultursuspension	$0,70 \pm 0,01$

### 3.2.1.4 Pelletoberfläche und Polysaccharidbildung

Zur Bestimmung des Oberflächen- zu Volumenverhältnisses wurde der Quotient aus Pelletumfang zu Pelletvolumen (Ellipsoid) gebildet. Das Pelletvolumen wurde ermittelt, indem die Pelletdicke am Mikroskop bestimmt wurde. Über die bekannten Durchmesser der projizierten Pelletfläche und die Pelletdicke wurde das Volumen entsprechender Ellipsoide berechnet und gegen die projizierte Pelletfläche aufgetragen (Abb. A.4). Statt der Pelletoberfläche wurde hier der Umfang als Maß für die Oberfläche verwendet, da dieser direkt aus der Bildauswertung zugänglich ist. Die Oberfläche des Pellets ist hingegen nur sehr schwierig zu bestimmen, da die Pellets zum einen auf der Oberfläche stark zerklüftet sind und zum anderen auf der Ober- und Unterseite nahezu glatt sind, wohingegen in der äquatorialen Eben lange Hyphenfortsätze zu finden sind. Aus dem ermittelten Volumen der ellipsoiden Pellets lässt sich daher nicht auf deren Oberfläche schließen.

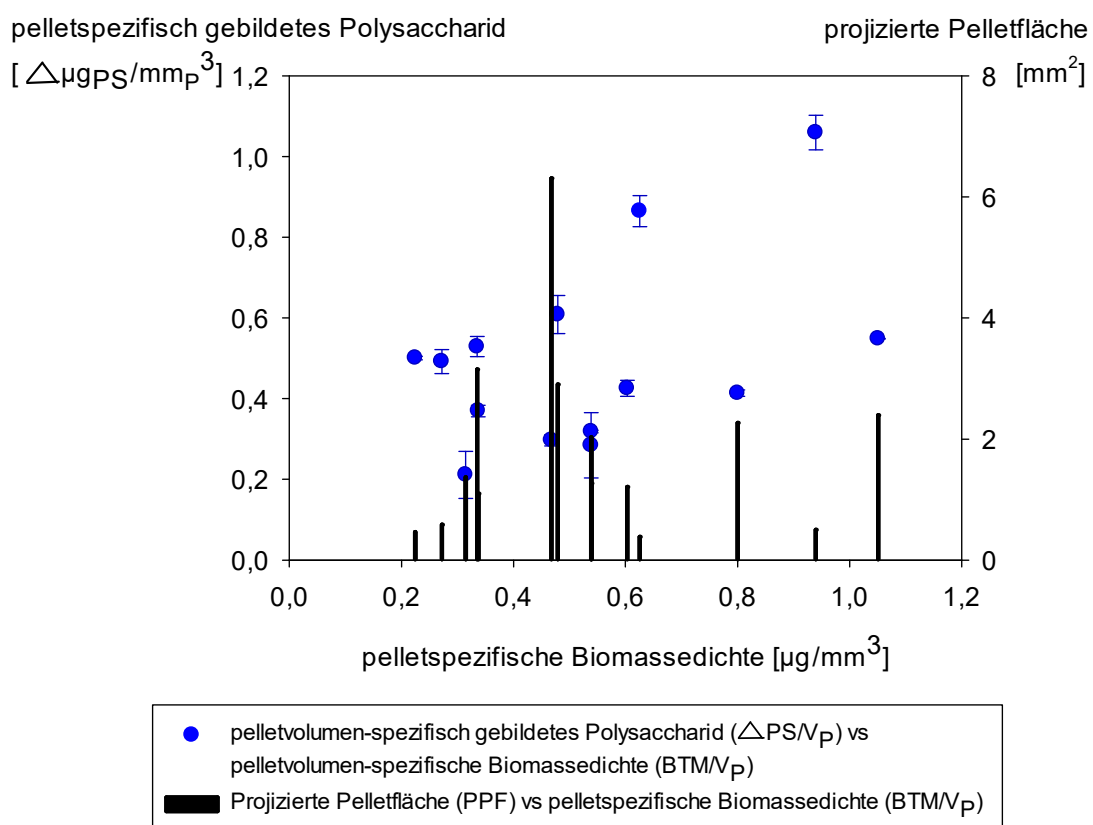
Mit zunehmendem Oberflächen- (Umfang) zu Volumenverhältnis der Pellets wurde mehr Polysaccharid gebildet. Somit wurde bei den kleinsten Pellets die höchste Polysaccharidbildung erreicht (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24:** Projizierte Pelletfläche und Polysaccharidbildung in Abhängigkeit vom Pelletumfang- zu Pellet-Volumen-Verhältnis. Daten aus Variation der Inokulumkon. in zweiter Vorkultur (zusätzlich auch Daten aus der Variation der Homogenisierung (Kap. 3.2.4)).

Eine Abhängigkeit von je Pelletquadratmillimeter (projizierte Pelletfläche multipliziert mit der Pelletkonzentration) gebildetem Polysaccharid mit der vorliegenden durchschnittlichen Pelletgröße, in Form sowohl der projizierten Pelletfläche oder auch des je Milliliter vorliegenden Pelletgesamtvolumens, ergab sich in dem untersuchten Bereich nicht.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen pelletvolumen-spezifischer Biomasse und der Größe der Pellets konnte auch hier nicht gefunden werden (vgl. Kapitel 3.2.1.3, Grauwert und Pelletdichte). An dieser Stelle wird jedoch zusätzlich betrachtet wie viel Polysaccharid die Pellets in Abhängigkeit ihrer Dichte und Größe bildeten (Abb. 3.25). Diese Untersuchung wurde vorgenommen, um den gemeinsamen Einfluss von Pelletdichte (pelletspezifische Biomassedichte) und Pelletgröße (projizierte Pelletfläche) zu bestimmen. Beide Größen können einen limitierenden Einfluss auf die Produktbildung haben, da sie zu Substratlimitierungen innerhalb von Pellets beitragen können.



**Abb. 3.25:** Pelletspezifische Polysaccharidbildung und projizierte Pelletfläche in Abhängigkeit der pelletspezifischen Biomassedichte. Daten aus Variation der Inokulumkonz. in zweiter Vorkultur (zusätzlich auch Daten aus der Variation der Homogenisierung (Kap. 3.2.4)).

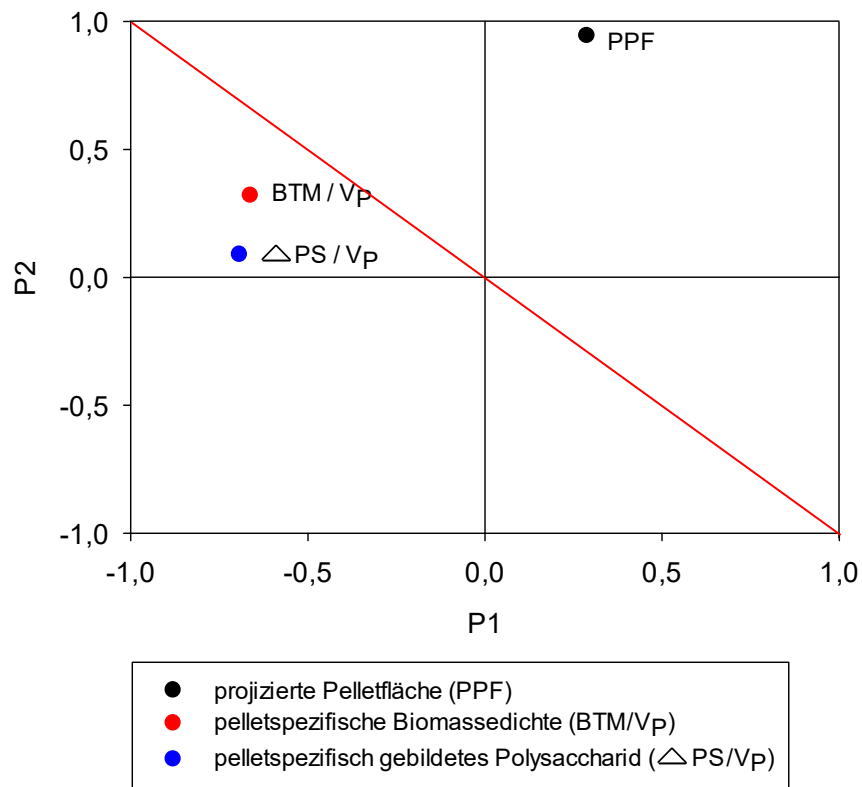
Wie in Abbildung 3.25 zu erkennen ist, stieg die pelletspezifisch gebildete Menge an Polysaccharid mit zunehmender Biomassedichte der Pellets tendenziell an. Die wachstumsassoziierte Bildung von Polysaccharid bei *S. commune* konnte somit auch durch die Morphologieuntersuchung bestätigt werden. Trotzdem bestanden deutliche Schwankungen und es konnte keine gute Regression zwischen pelletspezifischer Polysaccharidbildung und der Biomassedichte erhalten werden. Dies kann zum Teil auf die unterschiedliche Pelletgröße zurückgeführt werden, die daher zusätzlich in der Abbildung eingetragen ist. Insbesondere im rechten Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass Pellets bei vergleichbarer Biomassedichte deutlich mehr Polysaccharid produzierten, wenn sie kleiner waren. So wurden bei einer Biomasse von etwa  $1 \mu\text{g je mm}^3$  Pellet mehr als  $1 \mu\text{g}$  Polysaccharid gebildet, wenn das Pellet eine projizierte Pelletfläche von  $0,5 \text{ mm}^2$  aufwies. Bei einer Pelletgröße von  $2,4 \text{ mm}^2$  wurden hingegen nur  $0,55 \mu\text{g}$  Polysaccharid je  $\text{mm}^3$  Pellet produziert. Dies würde für eine Limitierung bei größeren Pellets sprechen. Es wurden jedoch auch umgekehrte Effekte beobachtet.

### *Hauptkomponentenanalyse*

Um einen besseren Gesamteindruck zu erhalten, wurden zusätzlich Ergebnisse weiterer Kultivierungen herangezogen und es wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Es wurden 29 verschiedene Kultivierungen herangezogen. Sowohl die Untersuchungen zur Variation der Inokulumkonzentration als auch Versuche der Variation von Homogenisierungsparametern gingen in die Datenanalyse ein, um ein möglichst breites Spektrum morphologischer Daten (aus zudem unterschiedlichen Maßstäben) abzudecken. Alle Werte, die zur Erstellung des Loading Plots verwendet wurden, sind im Anhang aufgelistet (Tab. A.1).

Variablen, die im *Loading Plot* (Abb. 3.26) ähnliche Koordinaten besitzen, also in etwa im gleichen Bereich liegen, korrelieren miteinander. Veränderte sich demnach die pelletspezifische Biomassedichte, so änderte sich die pelletspezifisch gebildete Menge an Polysaccharid in ähnlicher Weise. Variablen, die sich auf gegenüber voneinander liegenden Seiten der roten Linie befinden bzw. aufgetragen werden, sind negativ miteinander korreliert. Das bedeutet in dem hier festgestellten Zusammenhang für *S. commune*: Verändert sich die projizierte Pelletfläche, so verändern sich  $\text{BTM}/V_P$  und  $\Delta\text{PS}/V_P$  mit umgekehrtem Vorzeichen. Wurden die Pellets also größer, so wuchsen sie weniger dicht und bildeten gleichzeitig auf ihr spezifisches Volumen

bezogen auch weniger Polysaccharid. Der in Abbildung 3.25 entstandene Eindruck konnte somit mit Hilfe multivariater Datenanalyse als eindeutig bestätigt werden.

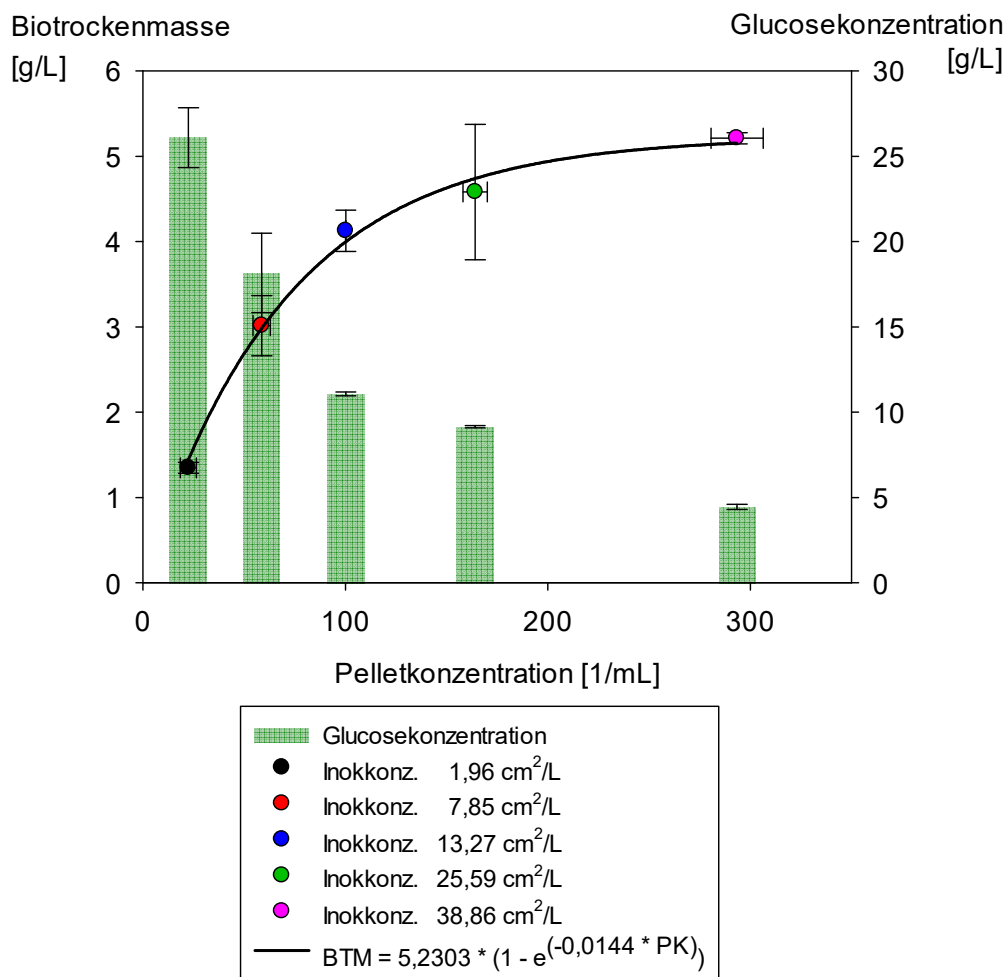


**Abb. 3.26:** Loading Plot einer Hauptkomponentenanalyse mit zwei Hauptkomponenten (P1 und P2), die zusammen 89 % der in den Daten enthaltenen Varianz beschreiben. Liegen Variablen im gleichen Bereich, korrelieren sie stark miteinander. Die rote Linie dient dem Vergleich der Variablen. Sie korrelieren positiv miteinander, wenn sie auf der gleichen Seite der Geraden liegen. Liegen Variablen auf der roten Linie gegenüber liegenden Seiten, korrelieren sie negativ miteinander. Es wurden die Ergebnisse von 29 verschiedenen Kultivierungen für die Berechnung herangezogen. Diese unterschieden sich hinsichtlich Inokulumkonzentration und/oder dem Kultivierungsschritt und den verwendeten Homogenisierungsparametern.



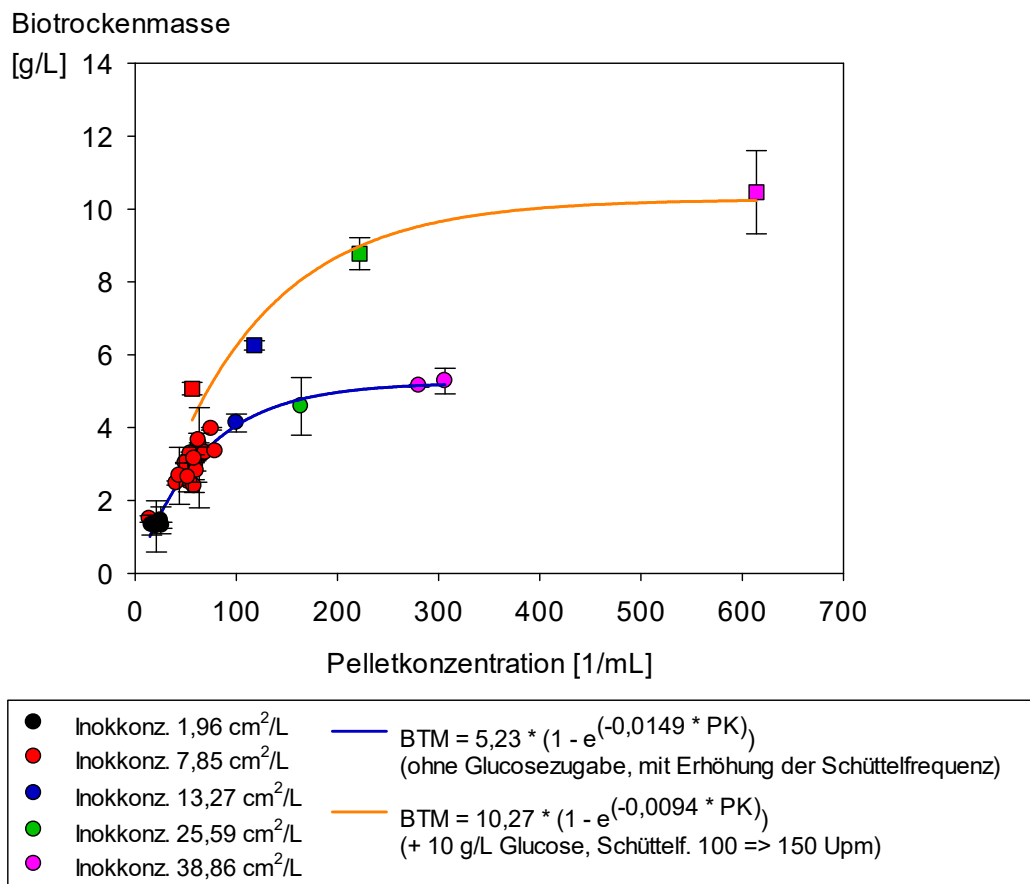
### 3.2.2 Einfluss der Schüttelfrequenz und Glucosekonzentration

Wie Abbildung 3.14 in Kapitel 3.2.1.1 zeigt, stieg die Konzentration der Biotrockenmasse bei hohen Pelletkonzentrationen kaum weiter an. Da die Glucosekonzentration bei den hohen Biomassekonzentrationen am Ende der Kultivierung unter 10 g/L lag, wurde vermutet, dass dies durch eine Substratlimitierung verursacht wurde und aufgrund der hohen Viskosität auch nicht mehr ausreichend Sauerstoff eingetragen werden konnte. Daher wurde getestet, welche Auswirkung eine Zugabe von Glucose nach 48 h hat, um ein Absinken der Glucosekonzentration unter 10 g/L zu vermeiden und zu testen wie sich zudem eine Erhöhung der Schüttelfrequenz auswirkt.



**Abb. 3.27:** Biotrockenmassekonzentration in Abhängigkeit der Pelletkonzentration von *S. commune* in erster Vorkultur bei Einsatz verschiedener Inokulumkonzentrationen. Zusätzlich ist die Glucosekonzentration dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet aus dreifacher Versuchsdurchführung.

Bei Erhöhung der Konzentration um 10 g/L Glucose sowie intensiverer Durchmischung durch Erhöhung der Schüttelfrequenz von 100 auf 150 Upm nach 48 h wurden noch mehr Pellets gebildet und die BTM stieg gleichzeitig weiter an (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28:** Biotrockenmassekonzentration in Abhängigkeit der Pelletkonzentration von *S. commune* in erster Vorkultur bei Einsatz verschiedener Inokulumkonzentrationen.

Bei über 600 Pellets/mL wurde eine BTM von ca. 10 g/L erreicht. Die Unabhängigkeit der BTM von der Pelletkonzentration im Bereich hoher Pelletkonzentrationen, wie sie zunächst vermutet wurde, existiert demnach nicht. Vielmehr lag eine Limitierung vor, wenn viel Inokulum eingesetzt wurde und die Glucosekonzentration und die Schüttelfrequenz nicht verändert wurden.

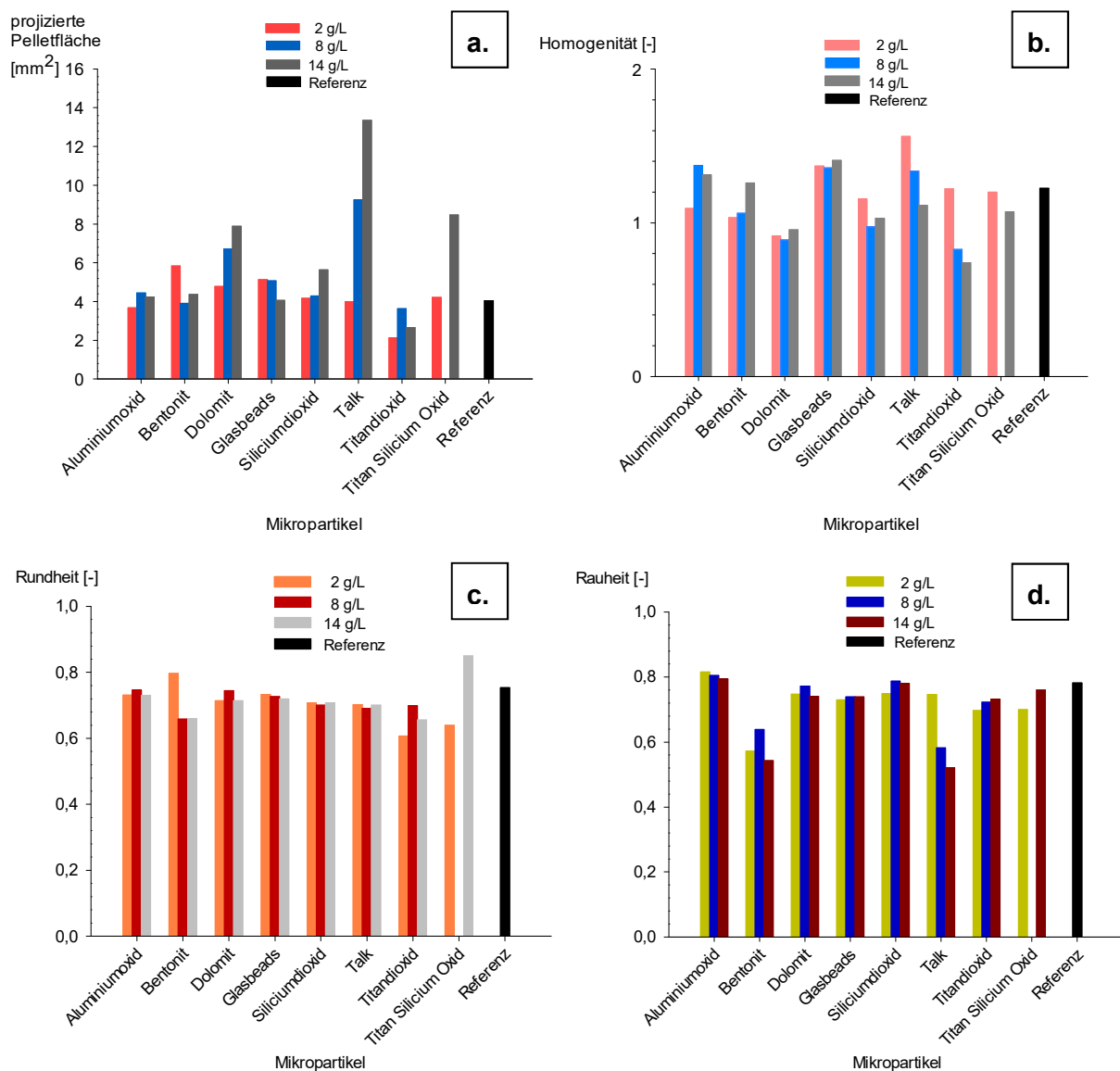
### 3.2.3 Einfluss von Medienzusätzen

Die Auswirkung von Medienbestandteilen auf die Morphologie filamentöser Pilze ist in der Literatur für zahlreiche Pilze beschrieben. In dieser Arbeit wurde nach auffälligen Veränderungen der Morphologie von *S. commune* bei Zusatz verschiedener Mikropartikel, erhöhten Salzkonzentrationen (Osmolalität) und der Konzentration von komplexen Medienbestandteilen gesucht. Zudem ist ein Vergleich mit dem filamentös

wachsenden Pilz *S. rolfii* aufgeführt, der ein nahezu identisches Polysaccharid produziert.

### 3.2.3.1 Einfluss von Mikropartikeln

Es wurden unterschiedliche Mikropartikel in verschiedenen Konzentrationen getestet. Angaben zur jeweiligen Spezifikation der Partikel befinden sich in Tabelle 2.4 im Material- und Methodenteil dieser Arbeit.



**Abb. 3.29:** Projizierte Pelletfläche (a.), Homogenität (b.), Rundheit (c.) und Rauheit (d.) der Pellets von *S. commune* in Abhängigkeit der zugesetzten Mikropartikel in Konzentrationen von 2, 8 und 14 g/L. Eine parallel durchgeführte Kultivierung ohne Mikropartikel wurde als Referenz genutzt.

Die projizierte Pelletfläche (Abb. 3.29, a) war im Vergleich zur Referenz bei einer Bentonitkonzentration von 2 g/L und bei Zugabe von 14 g/L Siliciumdioxid geringfügig

vergrößert. Mit zunehmender Dolomitkonzentration und insbesondere mit zunehmender Konzentration an Talkpartikeln wuchsen deutlich größere Pellets heran. Auch bei hohen Konzentrationen von Titan Siliciumoxid wurden deutlich größere Pellets gebildet als bei Kultivierung ohne Mikropartikel. Bei Kultivierung mit 14 g/L Talk wurde eine projizierte Pelletfläche von 13,4 mm<sup>2</sup> erreicht. Lediglich bei Zugabe von 2 und 14 g/L Titandioxid verringerte sich die projizierte Pelletfläche deutlich. Sie lag bei 2 g/L Titandioxid nur noch bei einer Fläche von 2,1 mm<sup>2</sup>.

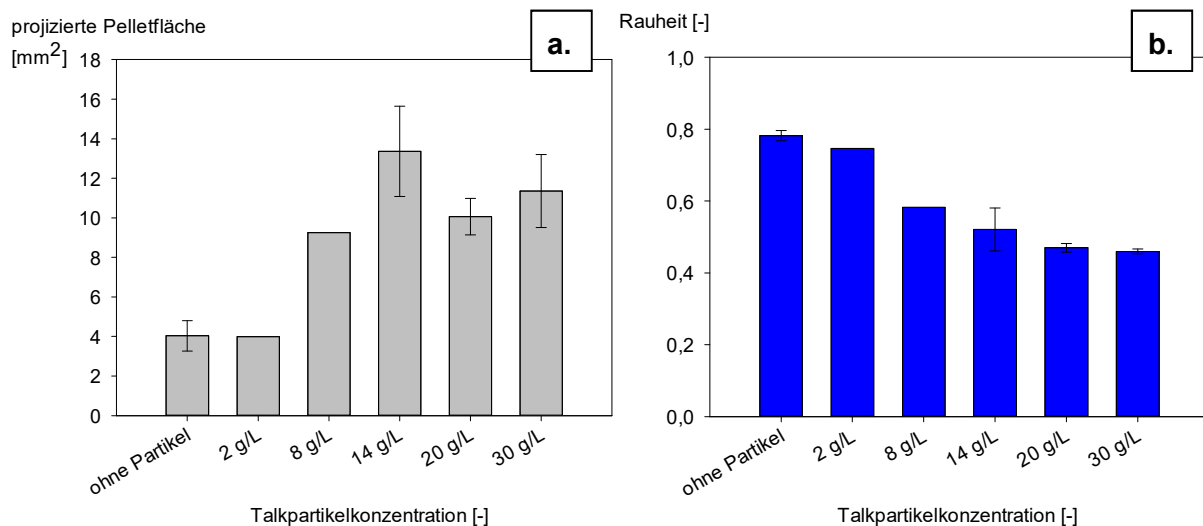
Eine weniger homogene Pelletgrößenverteilung bei Zugabe von Mikropartikeln lag nur in Kultursuspension mit Dolomitpartikeln (in allen Konzentrationen) und bei Kultivierung mit Titandioxid in Konzentrationen von 8 oder 14 g/L vor. Bei Zugabe von 2 g/L Talk lagen sogar weniger unterschiedlich große Pellets vor. Bei den weiteren Partikeln traten kaum Veränderungen in der Homogenität der Pelletgrößenverteilung auf.

Bei Verwendung nahezu aller der getesteten Mikropartikel waren die Pellets genauso rund wie in der Referenzkultivierung, in welcher ein Wert von 0,75 bestimmt wurde (Abb. 3.29, c.). Weniger runde Pellets lagen nur in den beiden Kultivierungen mit Titandioxid vor, in denen die gebildeten Pellets auch geringere projizierte Pelletflächen aufwiesen. Bei Zusatz von 2 g/L Titandioxid lag der Wert für die Pelletrundheit bei 0,61. Auch bei Verwendung höherer Bentonitkonzentrationen und bei Zusatz von 2 g/L Titan Silicium Oxid war die Rundheit etwas verringert. Ründere Pellets (0,85) traten nur bei Zugabe von 14 g/L Titan Silicium Oxid auf.

Die Rauheit der Pellets war bei Zusatz von Bentonitmikropartikeln aller getesteten Konzentrationen stark erhöht. Außerdem erhöhte sich die Rauheit mit zunehmender Konzentration an Talk sehr deutlich, wobei die stärkste Zunahme in der Rauheit zwischen 2 und 8 g/L Talk auftrat. Der niedrigste Wert für die Rauheit (somit die höchste Rauheit) wurde bei Kultivierung mit 14 g/L Talk gemessen; die Rauheit lag hier bei 0,52 (Referenz 0,78).

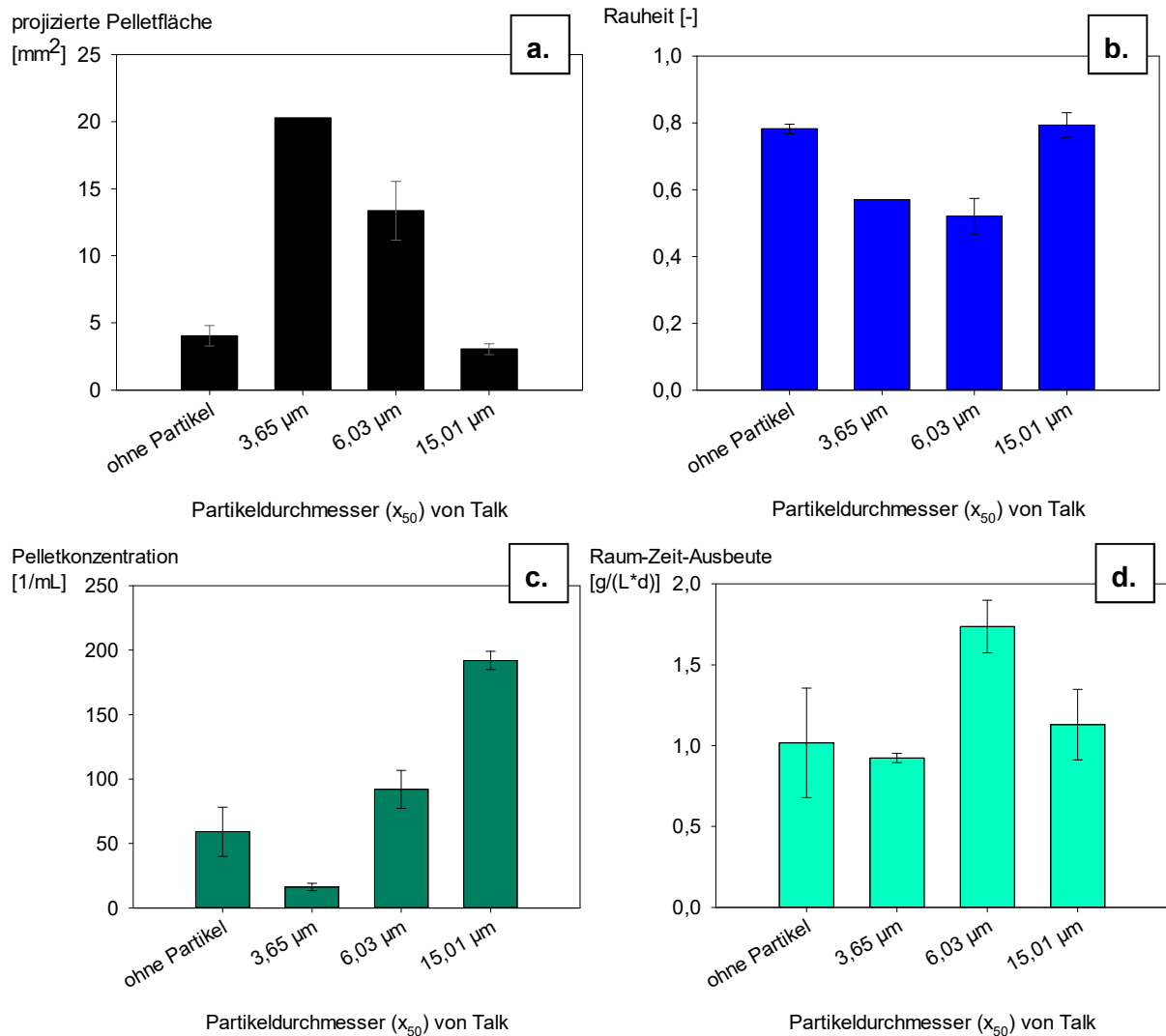
### 3.2.3.1.1 Talkpartikel

Da die Morphologie des Pilzes bei Zugabe von Talkpartikeln die auffälligste Veränderung aufwies, wurde der Effekt von Talk bei noch höheren Talkpartikelkonzentrationen untersucht. Darüber hinaus wurde auch die Auswirkung der Partikelgröße untersucht. Abb. 3.30 zeigt zusammenfassend das Verhalten von projizierter Pelletfläche und Rauheit bei Partikelkonzentrationen von 2 bis 30 g/L für Talkpartikel eines mittleren Durchmessers von 6,03  $\mu\text{m}$ . Bei einer Konzentration von 14 g/L wurde mit  $13,4 \pm 2,3 \text{ mm}^2$  die größte projizierte Pelletfläche erreicht. Damit waren die Pellets mehr als dreimal so groß wie ohne Partikelzugabe. Bei noch höherer Partikelkonzentration lag die projizierte Pelletfläche wieder etwas darunter. Die Rauheit lag bei der Partikelkonzentration von 14 g/L bei  $0,52 \pm 0,06$ . Die höchste Rauheit mit einem Wert von  $0,46 \pm 0,01$  wurde bei der höchsten Talkpartikelkonzentration erreicht. Da bei 14 g/L Talk die größte projizierte Pelletfläche erreicht wurde, diese großen Pellets zudem eine sehr hohe Rauheit aufwiesen und es bei weiterer Erhöhung der Partikelkonzentration kaum zu einer weiteren Veränderung der Morphologie kam, wurden Talkpartikel mit größerem bzw. kleinerem Partikeldurchmesser bei einer Konzentration von 14 g/L getestet.



**Abb. 3.30:** Projizierte Pelletfläche (a.) und Rauheit (b.) bei Kultivierung mit Talkpartikeln eines mittleren Durchmessers von 6,03  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Kultivierung ohne Partikel.

In Abbildung 3.31 sind die projizierte Pelletfläche, die Pelletrauheit sowie die Konzentration der gebildeten Pellets bei Verwendung von Talk mit drei unterschiedlichen Partikelgrößen eingetragen. Zudem ist auch die Raum-Zeit-Ausbeute aufgeführt, um mögliche Zusammenhänge mit der vorliegenden Morphologie aufzudecken.



**Abb. 3.31:** Morphologische Parameter (a. - c.) und Raum-Zeit-Ausbeute (d.) bei Kultivierung mit Talk verschiedener Partikelgröße ( $x_{50}$ : Median des Partikeldurchmessers) im Vergleich zu einer Referenz ohne Partikel.

Lagen während der Kultivierung sehr kleine Talkpartikel vor ( $x_{50} = 3,65 \mu\text{m}$ ), so wurden sehr große Pellets gebildet, jedoch lag in diesem Fall nur eine sehr geringe Pelletkonzentration vor. Die gebildeten Pellets wiesen ähnlich wie die Pellets aus Kultivierung mit Talk mittlerer Partikelgröße ( $x_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ ) sehr lange Hyphenfortsätze im äußeren Pelletbereich auf, was zu entsprechenden Werten bei der Pelletrauheit führte. Wurden deutlich größere Talkpartikel ( $x_{50} = 15,01 \mu\text{m}$ ) eingesetzt, so unterschieden sich die Größe und die Rauheit der gebildeten Pellets kaum von denen aus Kultivierung ohne Mikropartikel. Jedoch bildeten sich mit einer Pelletkonzentration von  $192 \pm 7$  Pellets deutlich mehr Pellets aus. Die Raum-Zeit-Ausbeute war bei vergleichbarer Pelletmorphologie und deutlich höhere Pelletkonzentration, die durch die Zugabe der großen Talkpartikel bewirkt wurde, im

Vergleich zur partikelfreien Kultivierung, unverändert. Analog zum in Abbildung 3.4 gezeigten Zusammenhang stieg die Konzentration der Biotrockenmasse aufgrund der höheren Pelletkonzentration (bei gleichzeitig etwas verringerter Pelletgröße) an. Mit der Zunahme an Biomasse stieg auch die Polysaccharidkonzentration etwas an (Tab. A.2). Von den sehr großen Pellets (20,3 mm<sup>2</sup>), die jedoch im Vergleich zur Referenz in deutlich geringerer Konzentration vorlagen, wurde in etwa genau so viel Polysaccharid pro Liter und Tag gebildet, wie von den Pellets mit 4 mm<sup>2</sup> projizierter Fläche, welche ohne Zugabe von Partikeln herangewachsen waren. Eine deutlich höhere Raum-Zeit-Ausbeute von 1,74 g/(L·d) wurde gemessen, wenn die Talkpartikel der mittleren getesteten Partikelgröße ( $x_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ ) eingesetzt wurden. Zwar lagen hier mehr Pellets vor und die projizierte Pelletfläche war deutlich größer, jedoch war damit kein Anstieg der Biotrockenmassekonzentration verbunden (Tab. A.2). Im Gegenteil, die Konzentration lag nur bei  $1,88 \pm 0,62 \text{ g/L}$ . Die Polysaccharidkonzentration lag hingegen bei  $4,71 \pm 0,51 \text{ g/L}$ . Es wurde somit ein sehr hoher spezifischer Ertrag ( $Y_{P/X}$ ) festgestellt.

Da die Raum-Zeit-Ausbeute und der Ertrag bei Verwendung der Talkpartikel mit der mittleren Partikelgröße am höchsten waren, wurden diese Partikel auch zur Untersuchung der Kultivierung in zweiter Vorkultur eingesetzt. Tabelle 3.4 zeigt wie sich Morphologie, Raum-Zeit-Ausbeute und Ertrag in zweiter Vorkultur im Vergleich zur Kultivierung ohne Partikel darstellten, wenn 14 g/L Talk mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 6  $\mu\text{m}$  zugegeben wurden. Die Kultursuspension wurde vor Beimpfen homogenisiert.

**Tab. 3.4:** Projizierte Pelletfläche (PPF), Pelletrauheit (R) sowie Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) und auf die gebildete Biomasse bezogener Ertrag bei Kultivierung mit Talkpartikeln ( $X_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ ) sowie parallel durchgeführter Kultivierung ohne Talkpartikel in zweiter Vorkultur.

	PPF [mm <sup>2</sup> ]	R [-]	RZA [g/(L·d)]	$Y_{P/X}$ [p <sub>PS</sub> /g <sub>BTM</sub> ]
14 g/L Talk	$1,30 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,02$	$2,87 \pm 0,22$	$1,67 \pm 0,09$
Referenz ohne Talk	$1,07 \pm 0,51$	$0,82 \pm 0,00$	$1,98 \pm 0,32$	$0,82 \pm 0,11$

Die in zweiter Vorkultur gebildeten Pellets bei Kultivierung mit den Partikeln waren nur wenig größer als bei Kultivierung ohne Partikel. In der ersten Vorkultur war der Effekt der Talkpartikel auf die Pelletgröße wesentlich stärker ausgeprägt. Die kleinen Pellets

waren analog zu den in erster Vorkultur unter Talkzugabe gebildeten Pellets wesentlich rauer als die Pellets, die unter Standardkultivierungsbedingungen gebildet wurden. Die zugegebenen Talkpartikel bewirkten auch hier die Ausbildung von langen Hyphenfortsätzen im Randbereich der Pellets (Abbildung A.5). Die Raum-Zeit-Ausbeute der Kultivierung mit Talk war mit knapp 3 g/(L·d) deutlich höher als in der Referenzkultivierung, in welcher nur etwa zwei Gramm Polysaccharid je Liter und Tag gebildet wurden. Zugleich war der Anteil an gebildetem Polysaccharid im Vergleich zur gebildeten Biomasse deutlich höher. Der auf die gebildete Biomasse bezogene Polysaccharidertrag verdoppelte sich bei der Zugabe von Talk.

Die morphologische Veränderung der Pellets, die in erster Vorkultur durch die Talkpartikel erreicht wurde, konnte auch bei Kultivierung in zweiter Vorkultur wiedergefunden werden. Dies war ein wichtiges Untersuchungsziel, da damit gezeigt werden konnte, dass der Effekt durch Talk gleichermaßen bei Einsatz von Luftmycel und Biomasse aus Flüssigkultur auftrat. Zudem konnte gezeigt werden, dass damit in beiden Fällen auch eine Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute und des Ertrags ( $Y_{P/X}$ ) zusammenhing.

Weitere Untersuchungen wurden bzgl. des Zugabezeitpunkts der Talkpartikel unternommen. So ist im Anhang in Abbildung A.6 dargestellt, in wie weit sich die Morphologie noch beeinflussen ließ, wenn die Talkpartikel statt zu Kultivierungsbeginn erst zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der Kultivierung zugegeben wurden. Es zeigte sich, dass die projizierte Pelletfläche mit zunehmend späterer Zugabe der Talkpartikel absank und bei Zugabe nach 40 h fast den Wert der Referenz erreichte. Die Rauheitswerte veränderten sich hingegen zunächst kaum und stiegen dann bei Zugabe nach 40 h sprunghaft auf den Wert der Referenz an. Wie die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung A.7 im Anhang zeigen, lagen bei Zugabe von Talk nach 40 h am Ende der Kultivierung (72 h) Talkklumpen im Medium vor. Die zugegebenen Talkpartikel standen dadurch offensichtlich nicht mehr zur Verfügung, um Veränderungen an der Morphologie auszulösen (Rauheit ab diesem Zeitpunkt der Kultivierung im Bereich der Referenzwerte).

Alle Ergebnisse zusammengefasst betrachtet, wird deutlich, dass Veränderungen an der Morphologie von *Schizophyllum commune* stark von Größe und Konzentration der Talkpartikel abhängig sind. Die Talkpartikel, welche die Morphologie am stärksten beeinflussten, hatten nach eigenen Messungen (Abb. A.1), einen mittleren



Durchmesser von etwa 6 µm. Der Effekt trat unabhängig von der Art des verwendeten Mycels, das für die Kultivierung eingesetzt wurde, auf und war auch noch zu beobachten, wenn die Partikel erst nach Beginn der Kultivierung zugegeben wurden.

### 3.2.3.1.2 Erzeugung großer Pellets mit Talkpartikeln

Wenige, aber dafür große Pellets bergen den Vorteil die Leistung der Kultivierung bzgl. Durchmischung und Stofftransfer nicht stark herabzusetzen. Dabei kommt es jedoch aufgrund von Limitierungen mit zunehmendem Pelletdurchmesser normalerweise zu Einbußen bei der Produktivität dieser Pellets. Mit Hilfe der Talkpartikel konnten jedoch große Pellets mit vergleichbar hoher Produktivität herangezogen werden (Abb. 3.31). Diese Ergebnisse wurden als Grundlage für die nachfolgend beschriebene Untersuchung herangezogen. Um zu untersuchen, ob die Talkpartikel geeignet sind, sehr große und trotzdem noch produktive Pellets zu erzeugen, wurde die Kultivierung von *S. commune* in mehreren Kultivierungsschritten durchgeführt ohne beim Überimpfen eine Homogenisierung der Pellets durchzuführen. Die Kultivierung erfolgte dazu in drei aufeinanderfolgenden Kultivierungsschritten jeweils im 500 mL-Schikanekolben.

**Tab. 3.5:** Projizierte Pelletfläche (PPF), biomassespezifischer Ertrag ( $Y_{P/X}$ ), Raum-Zeit-Ausbeute (RZA), pelletvolumen-spezifisch gebildetes Polysaccharid (PS) sowie pelletvolumen-spezifische Biomasse (BTM) in Kultivierung von *S. commune* mit Talkpartikeln (14 g/L) sowie vergleichend ohne Talk in zwei aufeinander folgenden Kultivierungsschritten.

		PPF	$Y_{P/X}$	RZA	pelletvol.sp. gebildetes PS	pelletvol.sp. BTM
		[mm <sup>2</sup> ]	[g <sub>PS</sub> /g <sub>BTM</sub> ]	[g/(L·d)]	[Δµg <sub>PS</sub> /mm <sub>P</sub> <sup>3</sup> ]	[µg <sub>BTM</sub> /mm <sub>P</sub> <sup>3</sup> ]
Zweite Vorkultur	mit Talk	17,35	0,85 ± 0,10	1,11 ± 0,12	0,15 ± 0,02	0,19 ± 0,01
	ohne Talk	2,61	0,79 ± 0,07	1,12 ± 0,05	2,63 ± 0,12	3,60 ± 0,26
Haupt- kultur	mit Talk	3,80	1,74 ± 0,00	1,08 ± 0,29	1,42 ± 0,38	1,09 ± 2,16
	ohne Talk	3,13	0,32 ± 0,08	0,64 ± 0,14	2,36 ± 0,51	8,22 ± 1,18

In zweiter Vorkultur konnten unter Einsatz von Talkpartikeln sehr große Pellets erzeugt werden. Ohne den Zusatz von Talk wurden viel kleinere Pellets gebildet. Für die Raum-Zeit-Ausbeute ergaben sich trotz dieser sehr unterschiedlich großen Pellets gleiche Werte. Jedoch zeigte sich, dass von den großen Pellets bezogen auf das gleiche

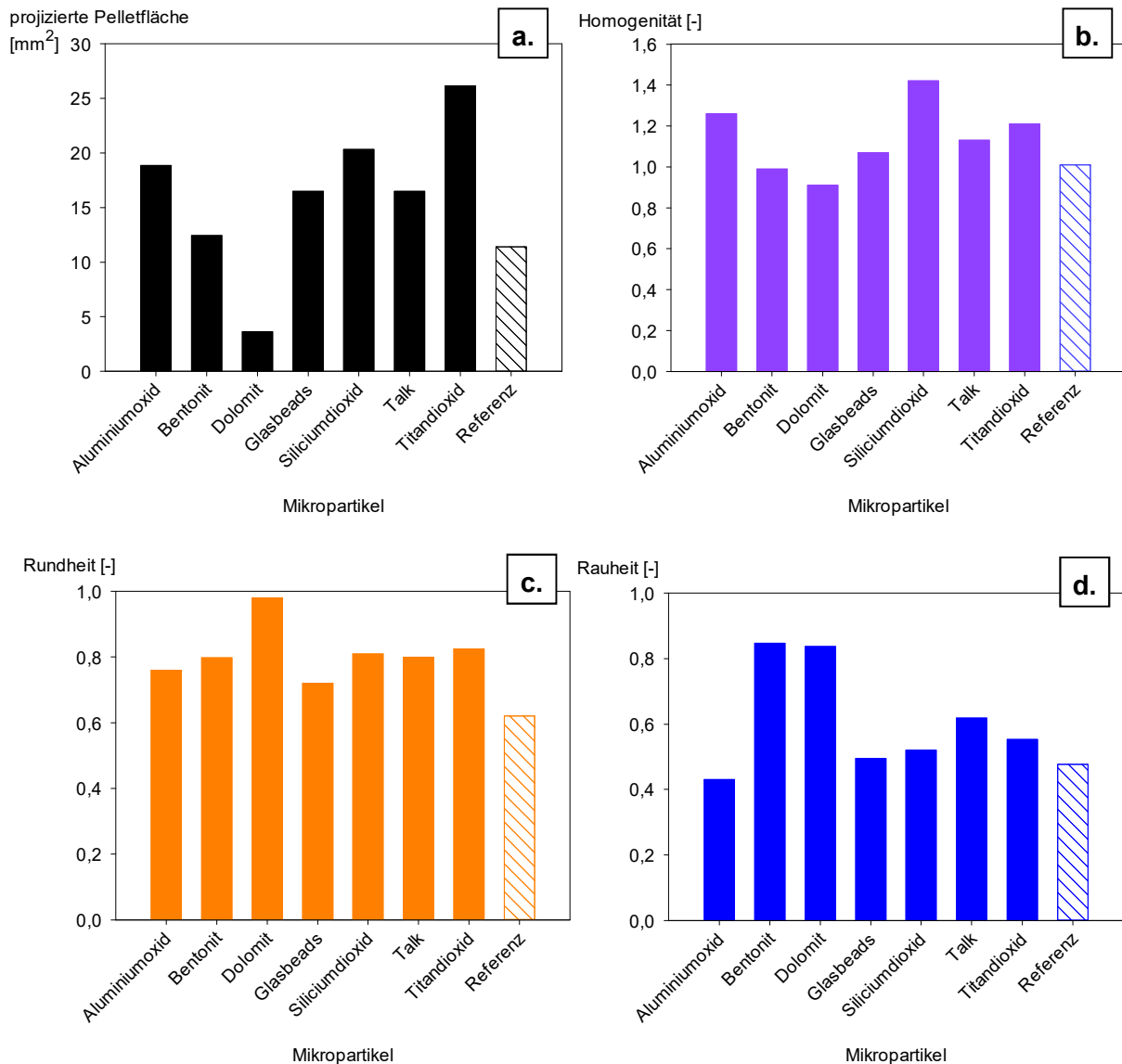
Pelletvolumen deutlich weniger Polysaccharid gebildet wurde. Dies ist zunächst ein eindeutiger Hinweis auf Limitierung innerhalb großer Pellets. Jedoch lag der biomassespezifische Ertrag für die deutlich größeren Pellets in etwa genauso hoch wie für die viel kleineren Pellets, welche bei herkömmlicher Kultivierung gebildet wurden. In der Hauptkultur war der Ertrag ( $Y_{P/X}$ ) sogar deutlich größer, wenn die Pellets in Anwesenheit von Talk weiterkultiviert wurden. Wird die Produktivität bzgl. des Pelletvolumens verglichen, so bildeten jedoch die Pellets aus Kultivierung ohne Talk mit dem gleichen Pelletvolumen mehr Polysaccharid.

Die Pellets der Kultivierung mit Talk waren in der Hauptkultur deutlich kleiner als noch in der zweiten Vorkultur, obwohl keine Homogenisierung zwischen den Kultivierungsschritten vorgenommen wurde und keine Maßstabsvergrößerung der Schikanekolben erfolgte, um erhöhte Scherkräfte zu vermeiden. Unter dem Mikroskop war zu erkennen, dass die mittlere projizierte Pelletfläche durch zahlreiche kleine Pellets, die aus Fragmenten der großen Pellets entstanden – vermutlich vormals Hyphenfortsätze aus dem Randbereich der großen Pellets –, deutlich verringert wurde. Da die Pellets aus Kultivierung mit und ohne Talk in der Hauptkultur in etwa vergleichbar groß waren und die Homogenität mit Werten von 0,51 (mit Talk) und 0,31 (ohne Talk) in beiden Fällen ähnlich gering war, können sehr gut vergleichbare Aussagen bzgl. der Produktivität der Biomasse getroffen werden. So wurde deutlich mehr Produkt statt Biomasse gebildet, wenn Talk zugegeben wurde. Je Gramm gebildeter Biomasse wurden 1,74 Gramm Polysaccharid gebildet. Da jedoch mehr Pellets vorhanden waren, wenn mit Talk kultiviert wurde, ergab sich ein höheres Pelletgesamtvolumen und dadurch eine geringere pelletvolumen-spezifisch gebildete Menge an Polysaccharid ( $\Delta\mu_{PS}/mm^3$ ).

Tab. 3.5 zeigt auch, dass die Biomassedichte in den Pellets aus Kultivierung mit Talk viel geringer war. Es ist somit naheliegend, dass aufgrund des geringeren Anteils an Biomasse auch weniger Polysaccharid gebildet wurde, die Biomasse jedoch aufgrund der geringeren Dichte gleichzeitig besser mit Nährstoffen versorgt wurde und dadurch eine erhöhte Produktivität möglich war. Zusammenfassend ausgedrückt, wurde von Pellets vergleichbarer Pelletgröße mehr Produkt gebildet, wenn diese eine deutlich geringere Biomassedichte aufwiesen und sie dann gleichzeitig in höherer Konzentration vorlagen. Diese Pellets mit geringer Biomassedichte konnten mittels Zusatz von Talkpartikeln erzeugt werden.

### 3.2.3.2 Einfluss von Mikropartikeln auf die Morphologie von *S. rolfssii*

Die Mikropartikel wirkten sich in Kultivierung von *S. rolfssii* anders auf die Morphologie aus als dies in den Kultivierungen von *S. commune* in Anwesenheit der entsprechenden Mikropartikel der Fall war.



**Abb. 3.32:** Projizierte Pelletfläche (a.), Homogenität (b.), Rundheit (c.) und Rauheit (d.) von Pilzpellets des Stamms *S. rolfssii* unter Anwesenheit von jeweils 10 g/L verschiedener Mikropartikel im Vergleich zur Ausprägung der morphologischen Parameter einer parallel durchgeführten Kultivierung ohne Mikropartikel (Referenz).

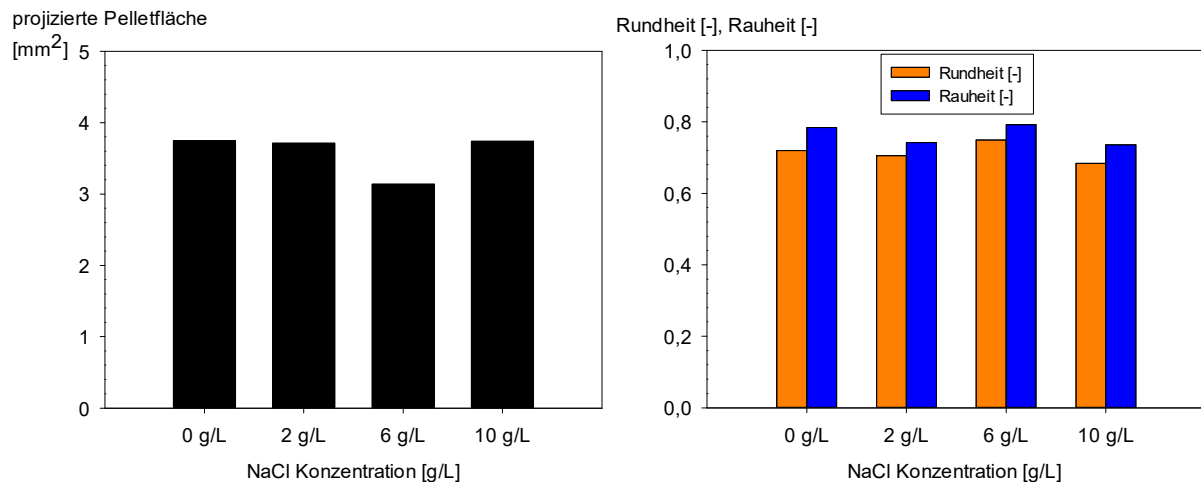
Im Gegensatz zum starken Einfluss der Talkpartikel auf die Morphologie von *S. commune* veränderte sich diese bei Zugabe von Talk in der Kultivierung von *S. rolfssii* kaum. Zudem wurden die Pellets verglichen mit denen von *S. commune* glatter anstatt rauer, wenn der Kultursuspension Talkpartikel zugefügt wurden. Den deutlichsten Effekt auf die Morphologie hatten die Dolomitpartikel. Diese bewirkten, dass die

gebildeten Pellets von *S. rolfsii* deutlich kleiner waren als die in der Referenzkultivierung herangewachsenen Pellets. Zudem waren die in Anwesenheit der Dolomitpartikel gebildeten Pellets nahezu kreisrund. Des Weiteren waren sie deutlich glatter als die Pellets, die entstanden, wenn die Kultivierung ohne Zugabe von Partikeln vorgenommen wurde. Ähnliche Effekte bezüglich der Rauheit und der Rundheit wurden auch beobachtet, wenn der Kultursuspension 10 g/L Bentonit hinzugefügt wurden. Die projizierte Pelletfläche veränderte sich im Vergleich zur Kultivierung ohne Partikelzusatz jedoch nicht. Die größten Pellets wurden bei Zusatz von Partikeln aus Titandioxid gebildet. Die Pellets waren auch unter Zusatz der  $\text{TiO}_2$ -Partikel runder als die in der Standardkultivierung (ohne Partikel) gebildeten Pellets. Die Rauheit der Pellets veränderte sich jedoch kaum. Auffällig war die sehr kompakte Struktur der Pellets und insbesondere der bündelartigen Hyphenfortsätze im Randbereich der Pellets (Abb. A.8). Veränderungen der Homogenität der Pelletgrößenverteilung traten durch die Zugabe der unterschiedlichen Mikropartikel kaum auf.

Der Polysaccharidgehalt konnte durch die Zugabe keiner der verschiedenen Partikel gesteigert werden. Auffällig war der Zusammenhang zwischen Pelletrauheit und Polysaccharidkonzentration am Ende der Kultivierung. Umso rauer die Pellets desto mehr Polysaccharid wurde gebildet. Für *S. commune* trat dies nur auf, wenn die Rauheit der Pelletoberfläche durch die Zugabe von Talk erhöht war. Ähnlich wie bei *S. commune* jedoch, wurde auch bei *S. rolfsii* eine Abhängigkeit der Biotrockenmassekonzentration von der Pelletkonzentration und der projizierten Pelletfläche festgestellt. Wurden große und dementsprechend weniger Pellets gebildet, so war die Biotrockenmassekonzentration gering. So lag zum Beispiel bei Bildung der sehr großen Pellets, welche bei Zusatz von Titandioxid gebildet wurden, die geringste Biotrockenmassekonzentration vor. Auf eine Darstellung aller Parameter der Kultivierung wurde verzichtet, da die Mikropartikel nicht zu einer Steigerung der Produktivität führten und daher keine weiteren Untersuchungen vorgenommen wurden.

### 3.2.3.3 Einfluss der Salzkonzentration

Um den Einfluss von Salzkonzentrationen bzw. der Osmolalität zu untersuchen, wurden dem komplexen Standardmedium bis zu 10 g/L NaCl hinzugefügt. Wie die Ergebnisse in Abbildung 3.33 zeigen, veränderte sich die Morphologie durch die erhöhte Salzkonzentration in diesem Screeningversuch im Vergleich zur Referenzkultivierung ohne NaCl-Zugabe nicht maßgeblich.



**Abb. 3.33:** Projizierte Pelletfläche (a.) und Rauheit sowie Rundheit (b.) der Pellets von *S. commune* bei Kultivierung im Komplexmedium unter zusätzlicher Verwendung von NaCl.

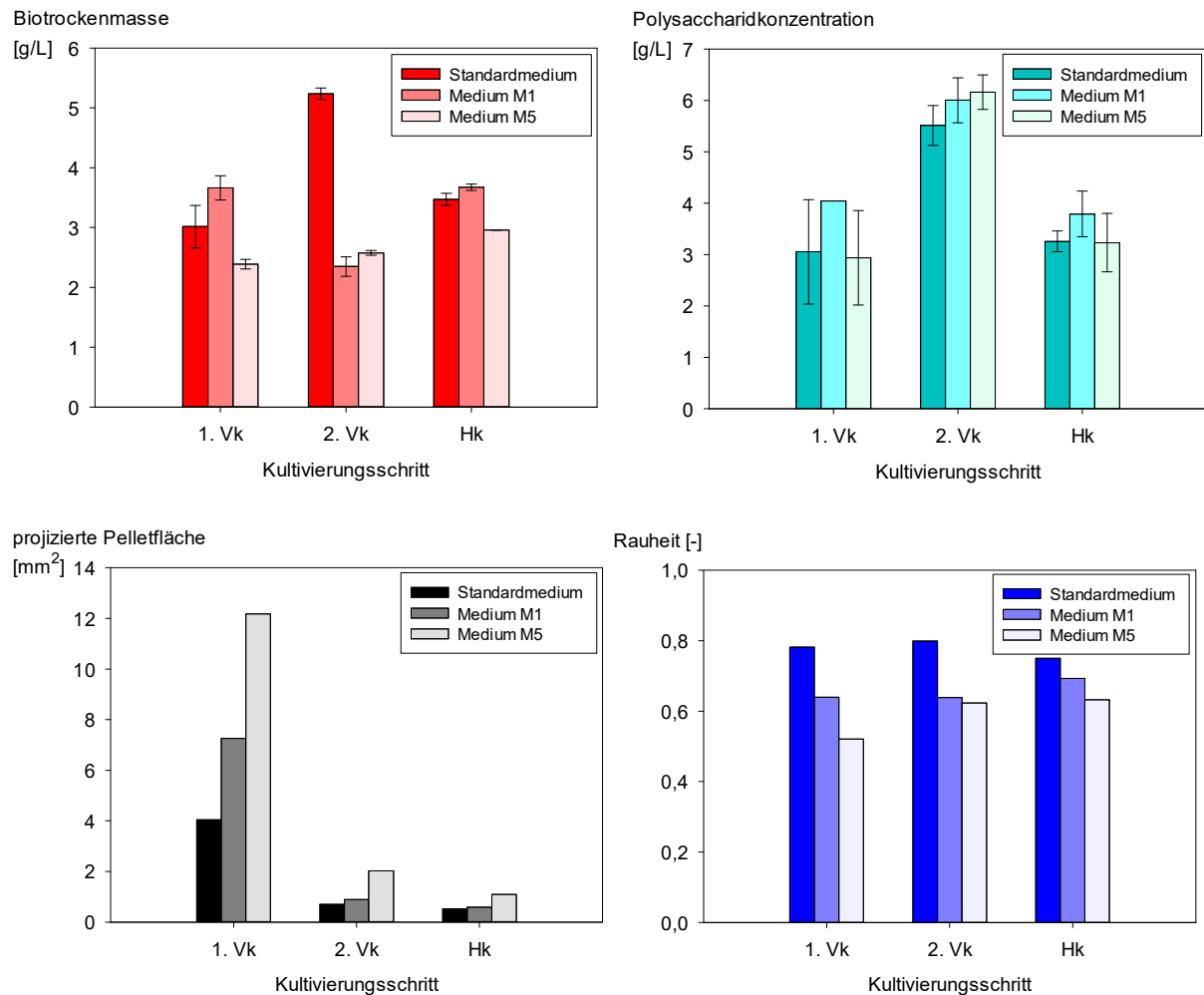
Auf weitere Untersuchungen (von Biomasse- und Produktbildung) wurde daher verzichtet. Zudem konnte aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die Einstellung des pH-Werts im Komplexmedium mit NaOH bzw. HCl nicht zu Veränderungen der Morphologie führte.

### 3.2.3.4 Einfluss der Komplexmediumkonzentration

Die Konzentration der Medienbestandteile des Standardmediums wurde variiert, um zu überprüfen, ob sich die Morphologie bei höheren Konzentrationen in Richtung mycelartigen Wachstums verändert. In einem Vorversuch wurden die Konzentrationen der Medienbestandteile wie in Kapitel 2.2.2 aufgeführt in verschiedenen Kombinationen erhöht. Entweder wurde die Konzentration jeweils eines einzelnen Bestandteils oder der verschiedenen Bestandteile gemeinsam erhöht. Es zeigte sich, dass bei sechsfach erhöhter Konzentration von technischem Hefeextrakt allein (Medium M1) oder bei gleichzeitiger Erhöhung von KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oder MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

ebenfalls um das Sechsfache (Medium M5), deutliche morphologische Veränderungen in der ersten Vorkultur auftraten (s. Abb. A.9). Die Pellets bei Kultivierung mit hoher Konzentration an technischem Hefeextrakt wiesen vermehrt lange Hyphenfortsätze im Randbereich auf und waren größer (Abb. A.9.1) als die Pellets der Referenzkultivierung. Bei genauer Betrachtung der Pellets, die sich bei hoher Glucosekonzentration bildeten, fällt auf, dass die Hyphenfortsätze im Randbereich eine etwas veränderte Struktur aufwiesen. Die Hyphen waren feiner verteilt und es lagen weniger bündelartig strukturierte Hyphen vor. Die Pellets der Kultivierung mit hoher Konzentration aller Medienbestandteile mit Ausnahme von Glucose waren deutlich größer als die der Referenz und wiesen noch deutlicher ausgeprägte und längere Hyphenfortsätze im Pelletrandbereich auf als bei ausschließlich erhöhter THE-Konzentration im Medium. Lagen alle Medienbestandteile einschließlich von Glucose in sechsmal so hoher Konzentration wie im Standardmedium vor, so sahen die Pellets (neben den bereits beschriebenen Veränderungen) zudem recht durchlässig aus (Abb. A.9.6). Die Medien mit 180 g/L Glucose wurden in den nachfolgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt, da bei den hohen Glucosekonzentrationen scheinbar eine Wachstumsinhibierung auftrat, denn auch die Konzentration der Biomasse lag in diesen Kultivierungen (Medium 4:  $1,64 \pm 0,00$ , Medium 6:  $1,00 \pm 0,04$ ) unter der Konzentration im Standardmedium ( $3,02 \pm 0,35$ ). Da die Konzentration der Pellets im Vergleich zum Standardmedium bei gleicher projizierter Pelletfläche jedoch nicht vermindert war, konnte gefolgert werden, dass die Biomassedichte innerhalb der Pellets deutlich geringer war.

Die Kultivierung wurde aufgrund der deutlichen morphologischen Veränderung in Medium M1 und Medium M5 in erster Vorkultur in diesen Medien auch in sich anschließenden Kultivierungsschritten untersucht. Nachfolgend sind morphologische und weitere Parameter in den verschiedenen Kultivierungsschritten dargestellt (Abb. 3.34). Alle Kultivierungen in zweiter Vorkultur (2. Vk) wurden mit homogenisierter Suspension aus Kultivierung in Standardmedium beimpft. Erst anschließend wurde getrennt voneinander in den verschiedenen Medien weiterkultiviert.



**Abb. 3.34:** Makromorphologische Parameter sowie Konzentration der Biotrockenmasse (BTM) und des Polysaccharids (PS) in Kultivierung von *S. commune* mit Standardmedium, Medium M1 und Medium M5 (Medienzusammensetzung siehe Tabelle 2.5, Kap. 2.2.2) in aufeinander folgenden Kultivierungsschritten. Zum Beimpfen aller Kultivierungen in zweiter Vorkultur (2. Vk) wurde homogenisierte Suspension der ersten Vorkultur (1. Vk) aus Kultivierung in Standardmedium verwendet. Die weitere Kultivierung erfolgte in den verschiedenen Medien getrennt voneinander.

Für die Angabe der Polysaccharidkonzentration wurden jeweils Referenzwerte gemessen und von den ermittelten Werten der Polysaccharidkonzentration in jeweiliger Kultursuspension abgezogen. Die Referenzwerte wurden gebildet, indem das entsprechende Medium so verdünnt wurde, wie die jeweils zugehörige Probe für die Aufarbeitung. Die Fällung wurde anschließend wie für den Überstand der Kultursuspension durchgeführt.

Die projizierte Pelletfläche war in Medium M1 in Vergleich zum Standardmedium etwas erhöht. In Medium M5 erreichte sie sogar einen Wert von 12,2 mm<sup>2</sup> (Abb. 3.34). Die Rauheit war in Medium M1 und M5 erhöht. In der Hauptkultur war der Unterschied in

der Pelletrauheit zwischen Pellets aus Kultivierung in Standardmedium und Pellets aus Kultivierung in den Medien M1 und M5 geringer. Die Pelletkonzentration erhöhte sich in Medium M1 proportional zur Pelletkonzentration bei Kultivierung in Standardmedium. In Medium M5 war die Pelletkonzentration deutlich herabgesetzt. Sie nahm jedoch, wie in den anderen Medien auch, von Kultivierung in zweiter Vorkultur auf Kultivierung in der Hauptkultur zu (Tab. A.3). Die Konzentration der Biotrockenmasse lag in der zweiten Vorkultur in den Medien M1 und M5 bei etwa 2,5 g/L. Demnach wurde nur halb so viel Biomasse gebildet wie in der Standardkultivierung. In der Hauptkultur stieg die Konzentration in Medium M1 und M5 geringfügig an. Bei Kultivierung im Standardmedium war die Biotrockenmassekonzentration in der Hauptkultur hingegen geringer. Die Polysaccharidkonzentration war in allen Kulturen der zweiten Vorkultur am höchsten. Unterschiede bestanden im Vergleich zur Kultivierung in Standardmedium nicht. Da die gebildete BTM im Standardmedium jedoch deutlich höher lag als in Medium M1 und M5, die Glucose jedoch überall vollständig verbraucht wurde, müssen in den Kultivierungen mit Medium M1 und M5 mehr Nebenprodukte gebildet worden sein.

Die geringere Pelletkonzentration sowie die damit zusammenhängende Erhöhung der projizierten Pelletfläche in der Hauptkultur bei Kultivierung mit Medium M5 ist wahrscheinlich durch eine nicht korrekte Abschätzung der BTM bei der Inokulation hervorgerufen. Die Start-BTM lag hier um etwa 0,1 g/L unterhalb der gewünschten Start-BTM von 0,25 g/L. In allen anderen Kultivierungen konnte die Start-BTM von 0,25 g/L mittels Pelletkonzentrationsbestimmung sehr genau eingestellt werden. Eine weitere potenzielle Fehlerquelle war der Homogenisierungsschritt zwischen der zweiten Vorkultur und der Hauptkultur. Hier konnte die Drehzahl in den Homogenisierungsgefäßen (DT-50-M-gamma) vom Antrieb (Ultra-Turrax Tube Drive) nicht immer über die gesamte Homogenisierungsdauer konstant gehalten werden, da die Viskosität der Kultursuspension der zweiten Vorkultur bereits sehr hoch war.

Die pelletvolumen-spezifisch gebildete Menge an Polysaccharid ( $\Delta\mu\text{g}_{\text{PS}}/\text{mm}_{\text{P}}^3$ ) in der zweiten Vorkultur war bei Kultivierung mit hoher Konzentration an tech. Hefeextrakt und hohen Salzkonzentrationen (Medium M5) fast so hoch wie im Standardmedium, wenngleich die projizierte Pelletfläche hier am größten war und nicht so viel Biomasse wie im Standardmedium zur Bildung des Polysaccharids zur Verfügung stand (Tab. A.3). Die Biomasse war hier jedoch auf ein größeres Pelletvolumen verteilt und die



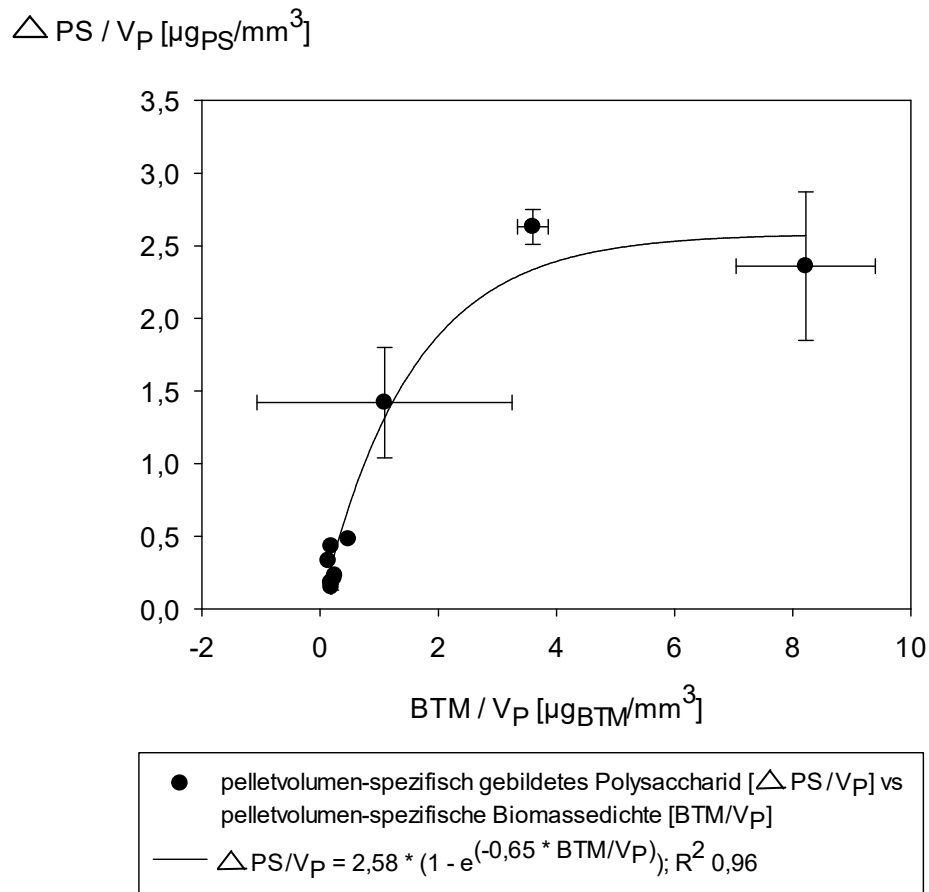
Pelletdichte war somit geringer (Tab. A.3). Wurde hingegen nur die THE-Konzentration selbst erhöht, so wurde bezogen auf das Pelletvolumen weniger Polysaccharid gebildet. Die projizierte Pelletfläche war in etwa so klein wie im Standardmedium ( $0,7 \text{ mm}^2$ ).

In der Hauptkultur wurde bezogen auf das vorhandene Pelletvolumen überall in etwa gleich viel Polysaccharid gebildet. Alle Werte fielen hier deutlich hinter die zweite Vorkultur zurück. Die beinahe doppelt so großen Pellets aus Medium M5 bildeten bei vergleichbarer Biomassekonzentration kaum weniger Polysaccharid wie die Pellets aus Kultivierung mit Standardmedium oder Medium M1. Die Biomassedichte war in diesen Pellets (M5) am geringsten. Pellets aus Kultivierung mit Standardmedium und Medium M1 hatten die gleiche Biomassedichte und waren in etwa gleich groß. Bei dieser sehr vergleichbaren Morphologie wurde auch die gleiche Menge an Polysaccharid gebildet und der biomassespezifische Ertrag lag bei jeweils knapp  $1 \text{ g}_{\text{PS}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ . Die hohe Konzentration des technischen Hefeextrakts hatte somit keine Auswirkung auf das Verhalten der Produktivität aufgrund von Veränderungen, die sich dabei beispielsweise im Metabolismus ergeben.

Der morphologische Unterschied zwischen den Kultivierungen mit Medium M5 und Medium M1 in der Hauptkultur wurde vermutlich zusätzlich durch ungleiche Biomassekonzentrationen zu Kultivierungsbeginn hervorgerufen. Jedoch waren auch in zweiter Vorkultur in Medium M5 bereits deutlich weniger Pellets vorhanden. Hier hatte die Start-BTM jedoch genau die gleiche Konzentration wie in Kultivierung mit Medium ohne die hohen Salzkonzentrationen (M1) sowie im Standardmedium. Somit muss hier die hohe Salzkonzentration für die niedrigere Pelletkonzentration verantwortlich gewesen sein. Dies könnte durch osmotische Schockwirkung auf das homogenisierte Inokulum bei Beimpfen verursacht worden sein.

Nachfolgend werden die Biomassedichte der Pellets (pelletvolumen-spezifische Biomasse) und die pelletvolumen-spezifisch gebildete Menge an Polysaccharid aus den Versuchen mit Talk (Kap. 3.2.3.1.2) mit den Werten, die sich bei Verwendung von konzentriertem Medium ergaben, zusammenfassend betrachtet. Die pelletvolumen-spezifisch gebildete Menge an Polysaccharid stieg proportional zur Pelletdichte an (Abb. 3.35). Dies galt bei geringen Pelletdichten von  $0,1$  bis etwa  $1,1 \text{ } \mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mmP}^3$ . Ab etwa  $4 \text{ } \mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mmP}^3$  erfolgte keine weitere Zunahme der pelletvolumen-spezifisch gebildeten Polysaccharidmenge mehr. Diese stagnierte bei den hohen

Biomassedichten der Pellets bei knapp  $\Delta 2,5 \mu\text{g}_{\text{PS}}/\text{mm}^3$ . Der Grund dafür liegt sehr wahrscheinlich in der verschlechterten Versorgung des Pelletinneren. Die entsprechenden Werte waren dabei gut vergleichbar, da die entsprechenden Pellets gleichgroß waren.



**Abb. 3.35:** Pelletvolumen-spezifisch gebildetes Polysaccharid in Abhängigkeit der pelletvolumen-spezifischen Biomassedichte. Auftragung der Werte aus Tabelle 3.5 und A.3.

Ein interessantes Beispiel sei hier herausgegriffen: Wurde die Kultursuspension in mehreren Kultivierungsschritten herangezogen, ohne dass beim Überimpfen eine Homogenisierung des Mycels erfolgte, so bildeten sich Pellets mit sehr hoher Biomassedichte von etwa  $8,2 \mu\text{g}_{\text{BTM}}$  je Pelletkubikmillimeter (Tab. 3.5). Wurde hingegen stringent homogenisiert, so hatten die Pellets eine um den Faktor 34 geringere Biomassedichte. Der Ertrag ( $Y_{P/X}$ ) lag dann deutlich über dem, welcher bei Ausbildung der dichteren Pellets erreicht wurde. Der höchste Ertrag wurde für Pellets mit der geringsten Biomassedichte erreicht (Tab. A.3). Bei der höchsten ermittelten Biomassedichte hingegen wurde der geringste Ertrag gemessen (Tab. 3.5).

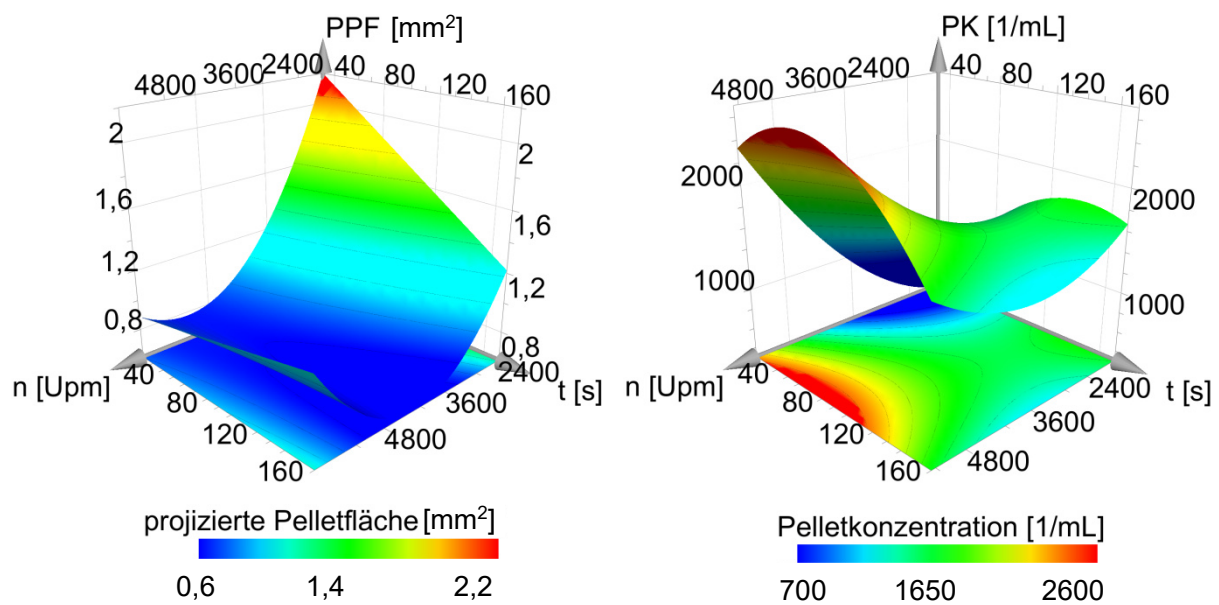
Der Trend zur Bildung weniger dicht gewachsener Pellets mit der Zunahme der Pelletgröße (vgl. Abb. 3.26) konnte zum Teil bestätigt werden. Jedoch hing die erzeugte Pelletdichte in diesem Fall stark von den gewählten Kultivierungsbedingungen ab. Überimpfen mit bzw. ohne Homogenisierung des Inokulums und das Medium bzw. ggf. Zugabe von Talk hatten einen starken Einfluss darauf wie dicht die Pellets wuchsen.

### **3.2.4 Einfluss der Homogenisierung des Inokulums**

Abbildung 3.36 und Abbildung 3.37 zeigen für die Kultivierung im Schüttelkolben und anschließende Kultivierung im Reaktormaßstab jeweils die projizierte Pelletfläche sowie die Pelletkonzentration in Abhängigkeit der beiden Einflussgrößen Drehzahl und Homogenisierungsdauer. Qualitativ ergaben sich zwischen diesen Einflussgrößen und der Morphologie sehr ähnliche Zusammenhänge unabhängig vom betrachteten Schritt der Homogenisierung in dem mehrstufigen Kultivierungsverfahren. Die Homogenisierungsparameter hatten beim Überimpfen von der ersten Vorkultur auf die zweite Vorkultur im Schüttelkolbenmaßstab sowie der Homogenisierung beim Überimpfen auf den Reaktormaßstab somit ähnliche Auswirkung. Den Modellen zufolge wird die größte projizierte Pelletfläche erreicht, wenn bei niedriger Einstellung beider Homogenisierungsparameter homogenisiert wird.

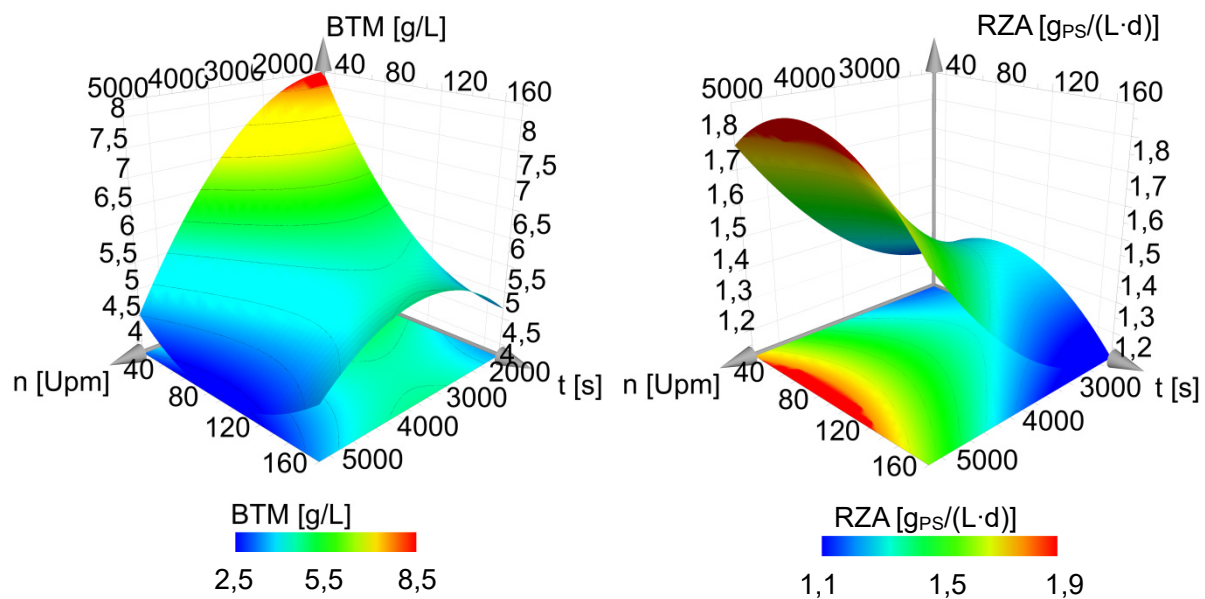
Zunächst wurden die Effekte der Homogenisierung im Schüttelkolbenmaßstab betrachtet: Die Drehzahl wirkt sich stärker auf die Pelletgröße aus, als die Dauer der Homogenisierung. Bei mittleren bis hohen Drehzahlen (4220 Upm) wird bei einer Homogenisierungsdauer von 170 s in zweiter Vorkultur ein ausgeprägtes Minimum der projizierten Pelletfläche von  $0,60 \pm 0,15 \text{ mm}^2$  (Standardabweichung gibt das Vorhersageintervall an) erreicht. In diesem Bereich ist der Einfluss der Homogenisierungsdauer sehr gering. Erfolgt die Homogenisierung bei dieser Drehzahl (4220 Upm) des Dispergierers für nur 30 s, werden unwesentlich größere Pellets mit einer Fläche von  $0,94 \pm 0,27 \text{ mm}^2$  gebildet. Wird die Pelletkonzentration betrachtet, so fällt auf, dass diese im Gegensatz zu der sich verringernden projizierten Pelletfläche ansteigt, wenn die Drehzahl erhöht und/oder die Homogenisierung länger durchgeführt wird. Bei kurzer Homogenisierung steigt die Pelletkonzentration mit zunehmender Drehzahl sehr stark an. Das Maximum von  $2646 \pm 417 \text{ Pellets/mL}$  wird im untersuchten Bereich bei sehr hohen Drehzahlen um 5300 Upm und kurzer bis mittlerer

Homogenisierungsdauer (81 s) erreicht. Wird hingegen für nur 30 s mit einer Drehzahl von 1780 Upm homogenisiert, fällt die Pelletkonzentration etwa um den Faktor 10 geringer aus. Wird, wie in diesem Beispiel, die Homogenisierung eingesetzt, um die Morphologie zu beeinflussen, zeigt sich der gleiche Zusammenhang zwischen der Pelletkonzentration und der projizierten Pelletfläche, wie er auch bei Variation der Inokulumkonzentration beobachtet werden konnte vgl. (Abb. 3.13 und 3.18).



**Abb. 3.36:** Projizierte Pelletfläche (PPF) und Pelletkonzentration (PK) nach Kultivierung in zweiter Vorkultur für 72 h in Abhängigkeit der eingestellten Drehzahl  $n$  und der Homogenisierungsdauer  $t$  bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus erster Vorkultur. Parametereinstellungen siehe CCC-Versuchsplan Tab. 2.10 und 2.11.

Zusätzlich zu den morphologischen Parametern wurden weitere Größen, wie beispielsweise die Raum-Zeit-Ausbeute untersucht, um zum einen den direkten Einfluss der Homogenisierung auf diese Größen aufzudecken, aber auch den Zusammenhang zu den morphologischen Ausprägungen aufzuklären.



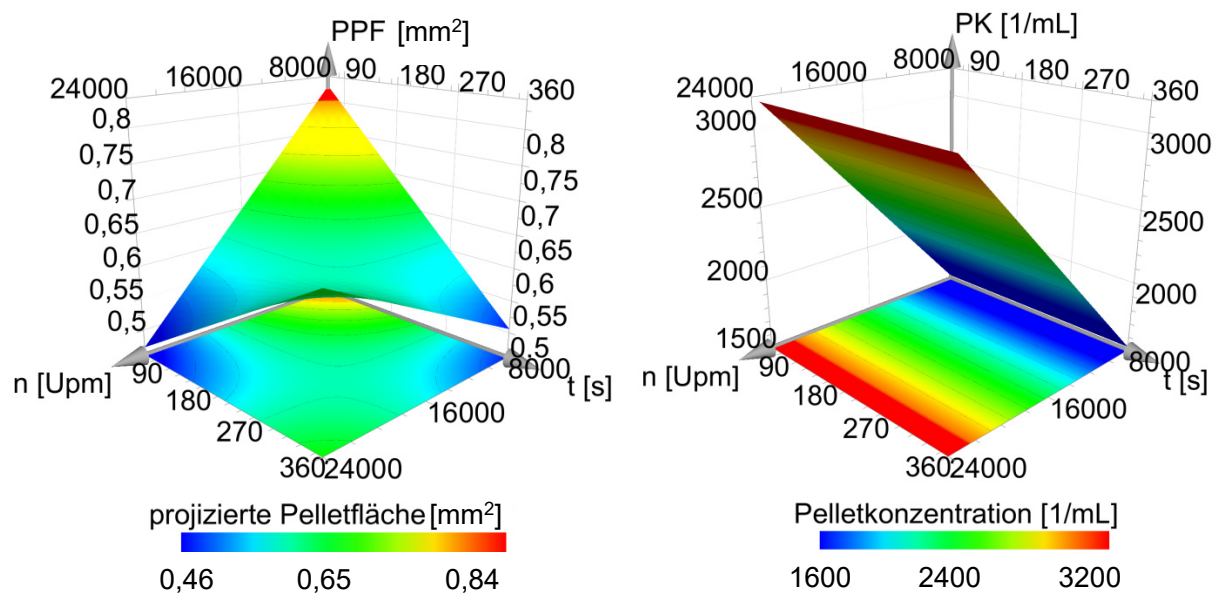
**Abb. 3.37:** Konzentration der Biotrockenmasse (BTM) und Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) nach Kultivierung in zweiter Vorkultur für 72 h in Abhängigkeit der Drehzahl  $n$  und der Homogenisierungsdauer  $t$  bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus erster Vorkultur. Parametereinstellungen siehe CCC-Versuchsplan Tab. 2.10 und 2.11.

Die Konzentration der Biomasse nimmt mit steigender Drehzahl stark ab, insbesondere bei kurzer Homogenisierung. Auch bei einer Verlängerung der Homogenisierungsdauer sinkt die Konzentration der Biomasse ab. Dieser Zusammenhang besteht hauptsächlich bei schwacher Homogenisierung mit niedriger Drehzahl. Bei sehr intensiver Homogenisierung ( $> 4500$  Upm) liegt nahezu unabhängig von der Dauer der Homogenisierung immer die gleiche Menge an Biotrockenmasse vor. Maximale bzw. minimale Biomassekonzentration betragen  $8,26 \pm 1,07$  g/L (1752 Upm, 30 s) bzw.  $3,77 \pm 0,72$  g/L (5370 Upm, 96 s). Ein Vergleich der *Response Surface* für die Biotrockenmassekonzentration in Abbildung 3.37 mit der *Response Surface* für die Pelletkonzentration (Abb. 3.36) zeigt, dass sich diese Zielgrößen einander entgegengesetzt verhalten. Die *Response Surface* für die Biotrockenmassekonzentration stellt sich als in vertikaler Ebene gespiegelter Graph der *response surface* für die Pelletkonzentration dar (qualitativ). Die höchste Konzentration der Biomasse wird bei der geringsten Pelletkonzentration erreicht. Wird umgekehrt die maximale Pelletkonzentration gebildet, so weist die Biotrockenmassekonzentration im untersuchten Bereich ein Minimum auf.

Die Raum-Zeit-Ausbeute nimmt mit zunehmender Drehzahl bei der Homogenisierung des Inokulums deutlich zu. Insbesondere bei Drehzahlen von über 4000 Upm ist der Anstieg besonders bemerkenswert. Die Homogenisierungsdauer hat nur geringen

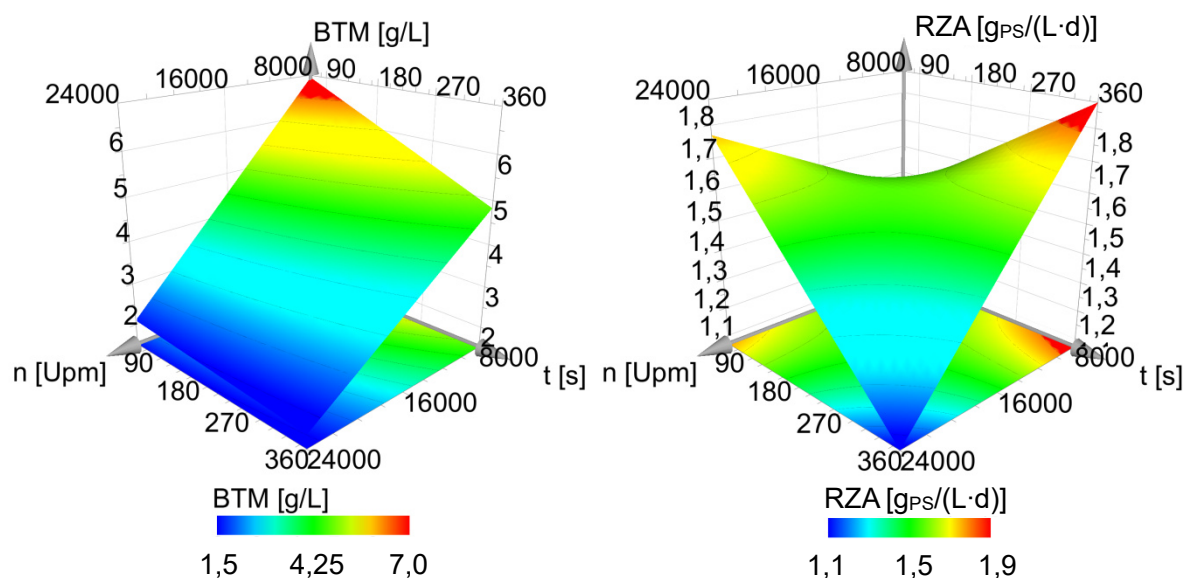
Einfluss. Die geringste Raum-Zeit-Ausbeute liegt mit  $1,11 \pm 0,08 \text{ g/(L}\cdot\text{d)}$  bei Homogenisierung für 170 s und einer Drehzahl von 2293 Upm vor. Das Maximum von  $1,88 \pm 0,07 \text{ g/(L}\cdot\text{d)}$  wird bei einer Homogenisierungsdauer von 86 s und einer Drehzahl von 5370 Upm erreicht. Die projizierte Pelletfläche liegt dann bei  $0,80 \pm 0,24 \text{ mm}^2$  und die Pelletkonzentration beträgt  $2647 \pm 415 \text{ Pellets/mL}$ . Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen, die bei Variation der Inokulumkonzentration gefunden wurden. Auch dort wurde die maximale Raum-Zeit-Ausbeute von etwa  $2 \text{ g/(L}\cdot\text{d)}$  bei entsprechenden Pelletkonzentrationen und vergleichbaren projizierten Pelletflächen gefunden (vgl. Abb. 3.18 mit Abb. 3.20).

Bei Untersuchung der Homogenisierung des Inokulums aus zweiter Vorkultur waren die Effekte der technisch unter etwas veränderten Bedingungen durchgeführten Homogenisierung ähnlich denen, die im Schüttelkolbenmaßstab beobachtet werden konnten. Die Pelletkonzentration war ausschließlich von der Drehzahl abhängig (Abb. 3.38). Die Homogenisierungsdauer hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Pellets, bewirkte jedoch, dass die Pellets bei der schwachen Homogenisierung etwas kleiner blieben. Im Gegensatz dazu wuchsen etwas größere Pellets heran, wenn die Homogenisierung für bis zu 6 min bei der vollen Leistung des Dispergierers (24.000 Upm) vorgenommen wurde. Die kleinsten Pellets ( $0,47 \pm 0,10 \text{ mm}^2$ ) bei gleichzeitig vorliegender höchster Pelletkonzentration ( $3216 \pm 545 \text{ Pellets/mL}$ ) wurden bei Homogenisierung mit 24.000 Upm für 1 min gebildet. Die Unterschiede im untersuchten Bereich waren jedoch deutlich geringer als bei Homogenisierung des Inokulums für die Kultivierung in der zweiten Vorkultur. Die Interpretation der Ergebnisse führt vor diesem Hintergrund und im Zusammenhang mit der geringen Modellvorhersagegüte (siehe  $Q^2$  in Abb. A.14) dazu, dass der Einfluss auf die projizierte Pelletfläche schwierig vorherzusagen ist.



**Abb. 3.38:** Projizierte Pelletfläche (PPF) und Pelletkonzentration (PK) nach Kultivierung im Bioreaktor (3 L) für 72 h in Abhängigkeit der eingestellten Drehzahl  $n$  und der Homogenisierungsdauer  $t$  bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus zweiter Vorkultur. Parametereinstellungen siehe FF-Versuchsplan Tab. 2.12 und 2.13.

Analog zu den aufgezeigten Zusammenhängen zwischen Morphologie und Biotrockenmassekonzentration bzw. Raum-Zeit-Ausbeute in der zweiten Vorkultur wurden auch für die Kultivierung im Reaktormaßstab mittels multipler linearer Regression entsprechende Modelle berechnet (Abb. 3.39).



**Abb. 3.39:** Konzentration der Biotrockenmasse (BTM) und der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) nach Kultivierung im Bioreaktor (3 L) für 72 h in Abhängigkeit der Drehzahl  $n$  und der Homogenisierungsdauer  $t$  bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus zweiter Vorkultur. Parametereinstellungen siehe FF-Versuchsplan Tab. 2.12 und 2.13.

Die Konzentration der Biotrockenmasse nimmt mit steigender Drehzahl bei der Homogenisierung stark ab. Die Dauer der Homogenisierung hat nur bei niedrigen Drehzahleinstellungen einen Einfluss auf die Biotrockenmassekonzentration. Dieses Verhalten entspricht qualitativ den auch in zweiter Vorkultur gemachten Beobachtungen (vgl. Abb. 3.37). Die niedrigste Konzentration von  $1,81 \pm 0,91$  g/L Biomasse liegt bei 24.000 Upm und einer Homogenisierungsdauer von 360 s vor. Wird hingegen nur kurz (60 s) und schwach (8.000 Upm) homogenisiert, so erreicht die Biotrockenmassekonzentration mit  $6,95 \pm 0,91$  g/L das Maximum im untersuchten Bereich. Die Raum-Zeit-Ausbeute nimmt mit zunehmender Drehzahl bei kurzer Homogenisierung zu. Sie steigt ebenso mit zunehmender Homogenisierungsdauer an, wenn die Drehzahl gering ist. Wird die Homogenisierung lang und mit hoher Intensität durchgeführt, sinkt die Raum-Zeit-Ausbeute jedoch ab. Das Maximum von  $1,88 \pm 0,22$  g/(L·d) liegt bei Homogenisierung für 360 s und gleichzeitig niedriger Drehzahleinstellung von 8.000 Upm vor. *Response Surface* Graphen für weitere Größen wie zum Beispiel die Homogenität der Pelletgrößenverteilung sind im Anhang aufgeführt (Abb. A.11 und A.13). Zudem sind die Regressionsgüte, die Vorhersagegüte und weitere statistische Größen im Anhang dargestellt (Abb. A.12 und A.14). Zudem listet Tabelle A.4 alle berechneten Polynome auf.

Tab. 3.6 fasst qualitativ zusammen wie sich die Morphologie in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter verändert und weiterführend die Biotrockenmasse und die Raum-Zeit-Ausbeute von der ausgebildeten Morphologie abhängen. Wird die Drehzahl des Dispergierers erhöht, so fällt die projizierte Pelletfläche stark ab und die Pelletkonzentration steigt stark an. Daran anknüpfend geht die Konzentration der Biotrockenmasse deutlich zurück, wenn die projizierte Pelletfläche stark abfällt und genauso wenn die Pelletkonzentration stark zunimmt.

**Tab. 3.6:** Ergebnisse des Homogenisierungseinflusses von verwendetem Inokulum qualitativ zusammengefasst für die Kultivierung im Schüttelkolben- und Reaktormaßstab. Pfeile zeigen an, ob und wie stark sich Einflussparameter bzw. Zielgrößen verändern. Änderung der projizierten Pelletfläche (PPF) und der Pelletkonzentration (PK) jeweils in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter. Änderung der Biotrockenmasse-konzentration (BTM) und der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) sowohl in Abhängigkeit der PPF (jeweils linke Spalte), als auch in Abhängigkeit der PK (jeweils rechte Spalte).

		PPF	PK	BTM	BTM	RZA	RZA
Drehzahl des Dispergierers	↗	↓	↑	↓	↓	↑	↑
Homogenisierungsdauer	↗	↘	↗	↘	↘	↗	→



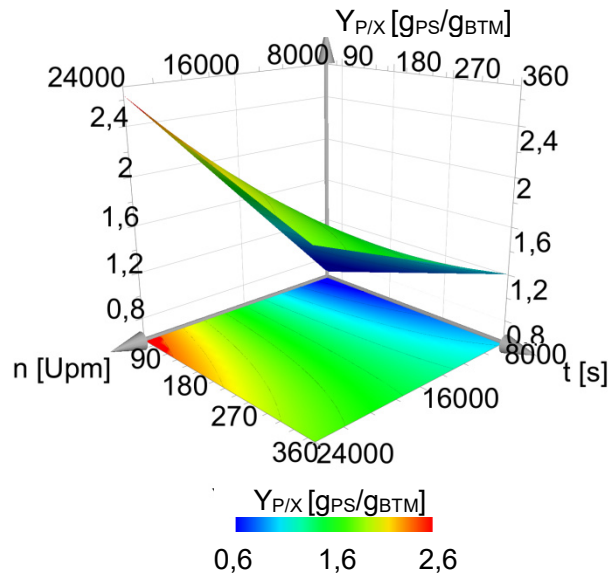
Die gezeigten Auswirkungen der Homogenisierung des Inokulums auf die Morphologie des nicht sporulierenden Pilzes *S. commune* wurden mit denen des ebenfalls nicht sporulierenden Pilzstamms, *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126, verglichen. Die Homogenisierung für diesen Pilz wurde bei den gleichen Einstellungen der Homogenisierungsparameter untersucht. *S. rolfsii* sekretiert das dem Schizophyllan analoge Scleroglucan als Produkt. Der Einfluss der Homogenisierung auf die Morphologie von *S. rolfsii* war vergleichsweise sehr gering. Dies zeigte sich bei Regression der Homogenisierungsparameter mit den morphologischen Zielgrößen. Für die mittels multipler linearer Regression berechneten Polynome wurde gefunden, dass keine oder nur sehr wenige Koeffizienten signifikant waren. Konnten Polynome mit signifikanten Koeffizienten gefunden werden, um ein Modell zu beschreiben, so umfassten diese Modelle jedoch nur einen geringen Teil der in den gemessenen morphologischen Daten liegenden Gesamtvariation (Abb. A.15 und A.16).

Die Morphologie von *S. rolfsii* konnte im Unterschied zu *S. commune* nicht durch Homogenisierung des Inokulums beeinflusst werden. Auch die Homogenisierung von Luftmycel von *S. rolfsii* und der Einfluss dieser auf die anschließende morphologische Entwicklung in Submerskultur in Schikanekolben wurde getestet. Hier konnten nur sehr geringe Einflüsse der Homogenisierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Pellets von *S. rolfsii* unterschieden sich zudem morphologisch deutlich von den Pellets, die von *S. commune* gebildet wurden. Die von *S. rolfsii* gebildeten Pellets waren vergleichsweise deutlich größer und rauer (Tab. A.5, Abb. A.17). Die auf äußerst ähnliche Weise kultivierten Pilzstämme zeigten somit spezifische und charakteristische Unterschiede.

#### **3.2.4.1 Spezifischer Ertrag in Abhängigkeit von Homogenisierung und Morphologie**

Für den aus gebildeter Polysaccharidmenge zu gebildeter Biomasse berechneten Quotienten ( $Y_{P/X}$ ) in den Kultivierungen im 3 L Reaktormaßstab wurde ebenfalls mittels multipler linearer Regression ein Modell erstellt (Abb. 3.40). Es zeigt, dass der spezifische Ertrag hauptsächlich von der Drehzahl abhängt. Der höchste spezifische Ertrag liegt bei 24.000 Upm und einer Homogenisierungsdauer von nur 60 s vor. Er beträgt bei diesen Einstellungen  $2,63 \pm 0,27 \text{ g}_{PS}/\text{g}_{BTM}$ .

Der niedrigste spezifische Ertrag ( $0,65 \pm 0,24 \text{ g}_{\text{PS}}/\text{g}_{\text{BTM}}$ ) liegt vor, wenn die Homogenisierung bei den niedrigsten Einstellungen der beiden Parameter betrieben wird.



**Abb. 3.40:** Biomassespezifischer Ertrag ( $Y_{P/X}$ ) nach Kultivierung im Bioreaktor (3 L) für 72 h in Abhängigkeit der eingestellten Drehzahl  $n$  und der Homogenisierungsdauer  $t$  bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus zweiter Vorkultur. Parametereinstellungen siehe FF-Versuchsplan Tab. 2.12 und 2.13.  $Y_{P/X} = -0,57 + 1,39 \cdot 10^{-4} \cdot n + 3,90 \cdot 10^{-3} \cdot t - 2,56 \cdot 10^{-7} \cdot n \cdot t$ . Regressionsgüte  $R^2 = 0,97$ , Vorhersagegüte  $Q^2 = 0,85$ , Modellvalidität  $M = 0,85$  und Reproduzierbarkeit  $\text{Rep} = 0,94$ .

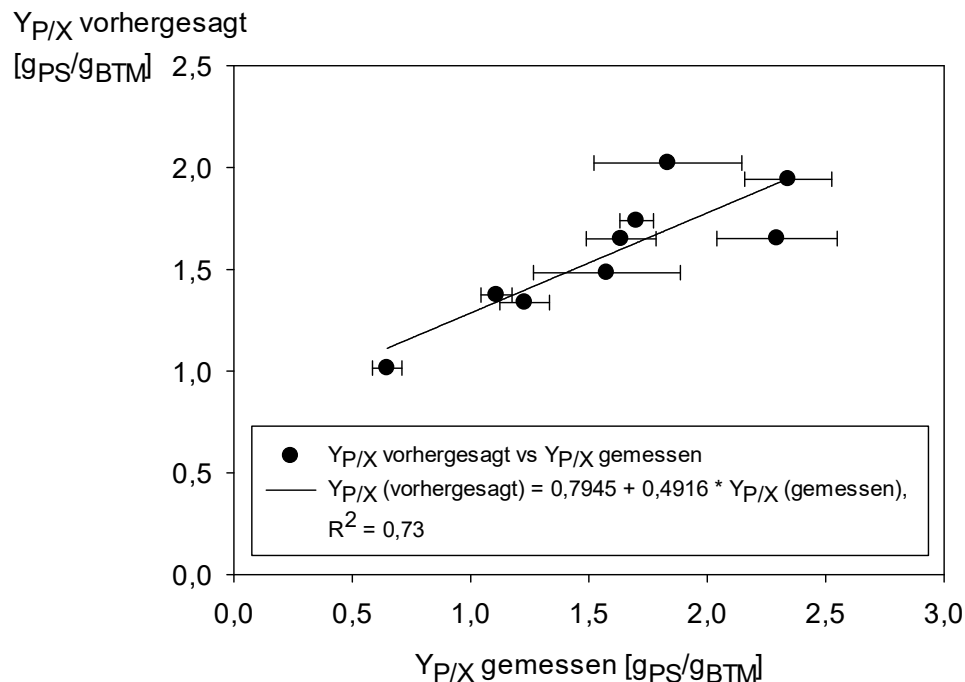
Zusätzlich wurde der spezifische Ertrag mit morphologischen Parametern (projizierte Pelletfläche und Pelletkonzentration) errechnet. Dazu wurden die in den Reaktorkultivierungen gemessenen Werte der spezifischen Erträge  $Y_{P/X}$  gegen die zugehörigen Pelletkonzentrationen sowie gegen die zugehörigen projizierten Pelletflächen aufgetragen. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt. Aus den beiden Linearfunktionen wurde ein lineares Gleichungssystem erstellt und im Additionsverfahren nach  $Y_{P/X}$  aufgelöst (Gl. 3.6).

$$Y_{P/X} = 1,22125 - 0,68115 \cdot \text{PPF} + 0,319 \cdot \text{PK} \quad (\text{Gl. 3.6})$$

mit PPF [ $\text{mm}^2$ ] und PK [ $1/\mu\text{L}$ ]

Damit kann der spezifische Ertrag in Abhängigkeit der projizierten Pelletfläche und der Pelletkonzentration berechnet werden. Mit Zunahme der Pelletfläche fällt er, wohingegen er bei einem Anstieg der Pelletkonzentration zunimmt. Die Messergebnisse, die bei Ausführung des Versuchsplans für  $Y_{P/X}$  bestimmt wurden,

sind in Abbildung 3.41 gegen die mit Gleichung 3.6 berechneten Werte aufgetragen. Dazu wurden in die Gleichung die experimentell bestimmten Werte für die projizierte Pelletfläche und für die Pelletkonzentration eingesetzt. Bis auf wenige und geringe Abweichungen konnte der spezifische Ertrag mit den morphologischen Parametern gut vorhergesagt werden.



**Abb. 3.41:** Mit Gleichung 3.6 vorhergesagter spezifischer Ertrag ( $Y_{P/X}$ ) in Abhängigkeit des gemessenen spezifischen Ertrags. Zur Berechnung wurden die projizierten Pelletflächen sowie die Pelletkonzentrationen, die sich bei Kultivierung von *S. commune* im Reaktormaßstab (3 L) gemäß Versuchsplan ergaben, in die Gleichung eingesetzt.

Es können jeweils insgesamt vier Werte für den spezifischen Ertrag miteinander verglichen werden (Tab. 3.7). Der experimentell ermittelte spezifische Ertrag ( $Y_{P/X\ G}$ ) auf dessen Grundlage das Modell zur Berechnung des spezifischen Ertrags in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter in Abbildung 3.40 erstellt wurde, der spezifische Ertrag berechnet aus der projizierten Pelletfläche und der Pelletkonzentration, die in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter angegeben werden können (Abb. 3.38) und der spezifische Ertrag, der mit Gleichung 3.6 aus diesen Werten errechnet werden kann ( $Y_{P/X\ BM}$ ) sowie der spezifische Ertrag, der direkt aus den gemessenen Werten für die projizierte Pelletfläche und die Pelletkonzentration mit Gleichung 3.6 errechnet werden kann ( $Y_{P/X\ BG}$ ).

**Tab. 3.7:** Spezifischer Ertrag berechnet in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter ( $Y_{P/X M}$ , Abb. 3.40) sowie bei den gewählten Einstellungen experimentell bestimmter spezifischer Ertrag ( $Y_{P/X G}$ ). Projizierte Pelletfläche ( $PPF_M$ ) und Pelletkonzentration ( $PK_M$ ) berechnet in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter sowie der daraus mit Gleichung 3.6 berechnete spezifische Ertrag ( $Y_{P/X BM}$ ) im Vergleich mit der mikroskopisch bestimmten projizierten Pelletfläche ( $PPF_G$ ), der gemessenen Pelletkonzentration ( $PK_G$ ) und dem spezifischen Ertrag ( $Y_{P/X BG}$ ) berechnet aus diesen gemessenen Werten (Gl. 3.6). Keine Angabe von Standardabweichung, wenn nur eine der zweifach ausgeführten Kultivierungen in die Auswertung einbezogen wurde (Angabe der Standardabweichung für  $Y_{P/X G}$  bezieht sich dann auf analytischen Fehler).

Parametereinstellung bei Homogenisierung		Erträge und morphologische Parameter			
Drehzahl	Homogenisierungsdauer	$Y_{P/X M}$	$PPF_M$	$PK_M$	$Y_{P/X BM}$
n	t	$Y_{P/X G}$	$PPF_G$	$PK_G$	$Y_{P/X BG}$
[Upm]	[s]	[g <sub>PS</sub> /g <sub>BTM</sub> ]	[mm <sup>2</sup> ]	[1/mL]	[g <sub>PS</sub> /g <sub>BTM</sub> ]
24000	60	2,63 ± 0,27 ( $Y_{P/X max.}$ )	0,47 ± 0,12	3216 ± 548	1,93 ± 0,26
		2,34 ± 0,18	0,46	3242	1,94
24000	360	1,96 ± 0,24	0,67 ± 0,10	3220 ± 548	1,79 ± 0,24
		1,70 ± 0,13	0,57 ± 0,19	2885 ± 437	1,75 ± 0,27
8000	60	0,65 ± 0,24	0,82 ± 0,12	1532 ± 535	1,15 ± 0,25
		0,65 ± 0,06	0,81	1083	1,01
8000	360	1,21 ± 0,24	0,51 ± 0,10	1528 ± 535	1,36 ± 0,24
		1,17 ± 0,06	0,50 ± 0,00	1254 ± 60	1,36 ± 0,02
16000	210	1,61 ± 0,21	0,62 ± 0,09	2373 ± 509	1,56 ± 0,22
		1,88 ± 0,30	0,64 ± 0,02	2798 ± 117	1,68 ± 0,04

In der Tabelle rot markiert sind jeweils der analytisch bestimmte Ertrag ( $Y_{P/X G}$ ) und der aus der gemessenen projizierten Pelletfläche und Pelletkonzentration berechnete spezifische Ertrag ( $Y_{P/X BG}$ ). Die größte Abweichung zwischen den gemessenen und den berechneten Werten lag bei 0,40 g<sub>PS</sub>/g<sub>BTM</sub>. Meist stimmten die Werte gut überein.

Über die Morphologie wird somit der spezifische Ertrag zugänglich, sodass bei gleichzeitiger Abschätzung der Biotrockenmasse aus der Morphologie während der Kultivierung (siehe Abb. 3.54 Kapitel 3.4.3) auch die gebildete Menge an Polysaccharid berechnet werden kann (Tab. A.6). Eine Berechnung der

Polysaccharidmenge direkt aus der projizierten Pelletfläche und der Pelletkonzentration war hingegen nicht möglich.

#### **3.2.4.2 Homogenisierung von inhomogener Vorkultur**

Es wurde untersucht wie sich die Morphologie der Pellets von *S. commune* entwickelte, wenn die Kultivierung in mehreren aufeinanderfolgenden Kultivierungsschritten ohne eine Homogenisierung der Kultursuspension erfolgte. Die auf diese Weise angezogene Kultursuspension wurde anschließend homogenisiert, um zusätzlich festzustellen, ob auch dann noch kleine Pellets mit homogener Größenverteilung nur mit Hilfe der Homogenisierung erzeugt werden konnten.

Die Kultivierung erfolgte in Schikanekolben. In der ersten Vorkultur, beimpft mit homogenisiertem Luftmycel, wurde noch ein Homogenitätswert von etwa 1 erreicht, wohingegen der Wert nach Überimpfen ohne Homogenisierung auf etwa 0,4 absank und in weiteren Kultivierungsschritten ohne Homogenisierung in etwa bei diesem Wert stagnierte (Abb. A.18). Nach zweimaligem Überimpfen wurde eine Homogenisierung dieser Pelletsuspension mit sehr inhomogener Pelletgrößenverteilung (3. VK) vorgenommen. Die Homogenisierung wurde mit verschiedenen Einstellungen der Homogenisierungsparameter vorgenommen. Diese sind in den Abbildungen im Anhang angegeben. Insbesondere bei intensiver Homogenisierung konnten kleine Pellets mit einer projizierten Pelletfläche von etwa 1,5 mm<sup>2</sup> und einer Homogenität von bis zu 1,6 erreicht werden (Abb. A.18). Die Homogenität lag damit im Bereich des Maximalwerts, der auch bei Untersuchung der Homogenisierung des Inokulums für die zweite Vorkultur erreicht wurde (vgl. Abb. A.11). Die Einstellungen von Drehzahl und Homogenisierungsdauer waren vergleichbar. Eine projizierte Pelletfläche von 1,5 mm<sup>2</sup> wurde auch bei Untersuchung der Abhängigkeit von den Homogenisierungsparametern bei Beimpfen der zweiten Vorkultur für Einstellungen der Homogenisierungsparameter zwischen etwa 3000 Upm für 30 s und 2000 Upm für 170 s gefunden (Abb. 3.36). In diesem Bereich lag eine Pelletkonzentration von etwa 1000 Pellets/mL vor. Diese Konzentration wurde bei entsprechender Pelletfläche auch für die Homogenisierung der inhomogenen Vorkultur erreicht. Damit konnte eine Polysaccharidkonzentration von knapp 5 g/L erreicht werden, die deutlich über der Konzentration von 2 g/L lag, welche in der Referenzkultivierung ohne

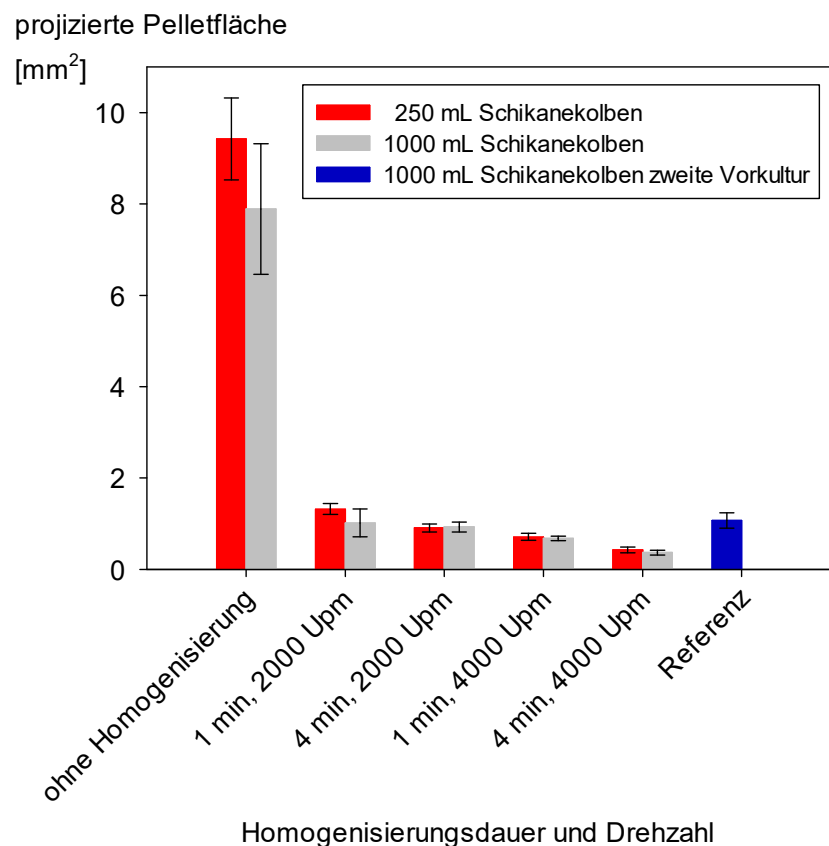
Homogenisierung erreicht wurde (Abb. A.18). Aus der sehr inhomogenen Vorkultur, konnte somit eine Kultursuspension mit vergleichsweise hoher Homogenität und kleinen Pellets generiert werden, sodass hohe Polysaccharidkonzentrationen erreicht wurden.

Für die Kultivierungen zur Untersuchung der Homogenisierung von inhomogener Vorkultur erfolgte die Inokulation volumenbezogen mit 5 % (v/v) Inokulum. Eine feste Konzentration der Biotrockenmasse zu Beginn der Kultivierung von 0,25 g/L konnte nicht eingestellt werden, da die Inhomogenität der verwendeten Vorkultur eine schnelle Abschätzung über die Pelletkonzentration nicht zuließ. Die gravimetrische Messung der Biotrockenmassekonzentration ergab, dass bei Inokulation eine Konzentration von  $0,34 \pm 0,04$  g/L vorlag. Die Pellets waren vergleichsweise größer und die Pelletkonzentration entsprechend geringer als für diese vergleichsweise etwas höhere Konzentration der Biotrockenmasse zu Kultivierungsbeginn erwartet. Die zum Teil sehr großen Pellets in der zum Homogenisieren verwendeten Vorkultur könnten aufgrund von Limitierungen im Inneren einen erhöhten Anteil von inaktiver oder abgestorbener Biomasse enthalten, die nach Homogenisierung nicht mehr zu neuen Pellets anwuchs. Die Pelletgrößenverteilungen in der dritten Vorkultur zeigen die inhomogene Pelletgrößenverteilung mit einigen Pellets deren projizierte Pelletfläche deutlich über 5 mm<sup>2</sup> lag (Abb. A.19). Die Aufnahme eines Pelletschnitts durch die äquatoriale Pelletebene eines der großen Pellets von *S. commune* zeigte, dass nur ganz im Zentrum Bereiche mit wenig Biomasse vorlagen, die aufgrund von Lyse entstanden sein könnten (Abb. A.20).

Um bei Homogenisierung von inhomogener Vorkultur noch kleinere Pellets zu erzeugen, kann die Inokulumkonzentration erhöht bzw. angepasst werden. Die für eine optimale Produktivität gewünschte Morphologie auch in einem Kultivierungsverfahren ohne Homogenisierung der Vorkulturen einzustellen, ist somit durch entsprechende Einstellung der Homogenisierungsparameter und ggf. zusätzliche Anpassung der Inokulumkonzentration möglich.

### 3.2.5 Einflüsse des Scale-up auf die Morphologie

Die Auswirkung einer Maßstabsveränderung auf die entstehende Pilzmorphologie wurde im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Die Kultivierung in erster Vorkultur wurde unter den Bedingungen maximaler Reproduzierbarkeit (Tab. 3.1) durchgeführt. Nach anschließender Homogenisierung des Inokulums bei 5000 Upm für 60 s wurde auf die zweite Vorkultur (1000 mL Schikanekolben) überimpft. Die Suspension aus zweiter Vorkultur wurde unter verschiedenen Homogenisierungseinstellungen auf Schikanekolben gleicher Größe (1000 mL) und zusätzlich jeweils auf deutlich kleinere Schikanekolben (250 mL) überimpft. Zudem wurde auch Kultursuspension untersucht, die nicht homogenisiert wurde und somit die Auswirkung der Maßstabsveränderung auf unbeschädigte Pellets untersucht. In Abbildung 3.42 ist die projizierte Pelletfläche dargestellt, die sich bei verschiedenen Homogenisierungseinstellungen des Inokulums in der anschließenden Kultivierung in 1000 mL bzw. 250 mL Schikanekolben ergab. Zusätzlich ist die projizierte Pelletfläche der Pellets aus zweiter Vorkultur aufgeführt.



**Abb. 3.42:** Projizierte Pelletfläche von *S. commune* nach 72 h Kultivierung im 250 mL und 1000 mL Schikanekolben bei unterschiedlicher Dauer und Intensität der Homogenisierung des eingesetzten Inokulums. Alle Kultivierungen mit 5% (v/v) Inokulum gestartet.

Es wurden unabhängig von der gewählten Größe des Schikanekolbens Pellets gleicher Größe gebildet. Nur die Homogenisierung hatte Einfluss auf die Größe der Pellets. Sogar bei Inokulation mit ganzen Pellets zeigte sich kaum ein Unterschied zwischen den Kultivierungen in Kolben unterschiedlicher Größe. Zwar waren die Pellets im großen Kolben etwas kleiner, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zur Kultivierung in kleinerem Maßstab. Es wurde angenommen, dass im größeren Kolben deutlich kleinere Pellets vorliegen würden, da vermutet wurde, dass aufgrund erhöhter Scherung mehr Pellets entstehen würden. Auch die Pelletkonzentration war jedoch kaum erhöht. In 1000 mL Kolben lagen  $76 \pm 21$  Pellets/mL vor und im 250 mL Kolben waren  $60 \pm 12$  Pellets/mL vorhanden.

### **3.3 Automatisierung der Mikroskopie**

Die Automatisierung der Mikroskopie wurde vorgenommen, um den manuellen Aufwand zur Bildaufnahme von Pilzpellets zu verringern. Das entwickelte automatische Verfahren sollte zudem als Prototyp für at-line Analysen dienen (*proof of concept*), sodass die Morphologie im Kultivierungsverlauf durch geringen personellen Aufwand möglichst zeitnah verfolgt werden kann.

Zunächst wurden Machbarkeitsuntersuchungen zur Automatisierung der Mikroskopie anhand von Pellets aus einer ersten Vorkultur vorgenommen. Die Pellets wurden dazu bei verschiedenen Förderraten einer peristaltischen Pumpe in Kombination mit unterschiedlichen Belichtungszeiten der Kamera durch eine Glasküvette gepumpt (Tab. 2.6 und 2.7). Diese beiden Parameter wurden untersucht, um festzustellen, ob beispielsweise bei hohen Förderraten eine gegenüber der Mikroskopie per Hand verkürzte Belichtungszeit zu gleichen Ergebnissen für die morphologischen Parameter führt. Bei den gewählten Förderraten der Pumpe zirkuliert die Suspension bei der gewählten Dauer der Zeitreihenaufnahmen 3-mal (200 mL/min), 4,4-mal (300 mL/min) bzw. 5,9-mal (400 mL/min) vollständig. Jedes Pellet kann somit theoretisch entsprechend oft detektiert werden.

In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass bei größerem Volumen in der Schottflasche eine gleichmäßige Verteilung aller Pellets (alle Pelletgrößen) nur bei höheren Umdrehungen des Magnetrührers (mindestens 175 Upm) erreicht wurde.



Somit wurde ein geringeres Suspensionsvolumen (500 mL) gewählt, um Schädigung der Pellets durch den Rührkern zu minimieren bzw. zu vermeiden.

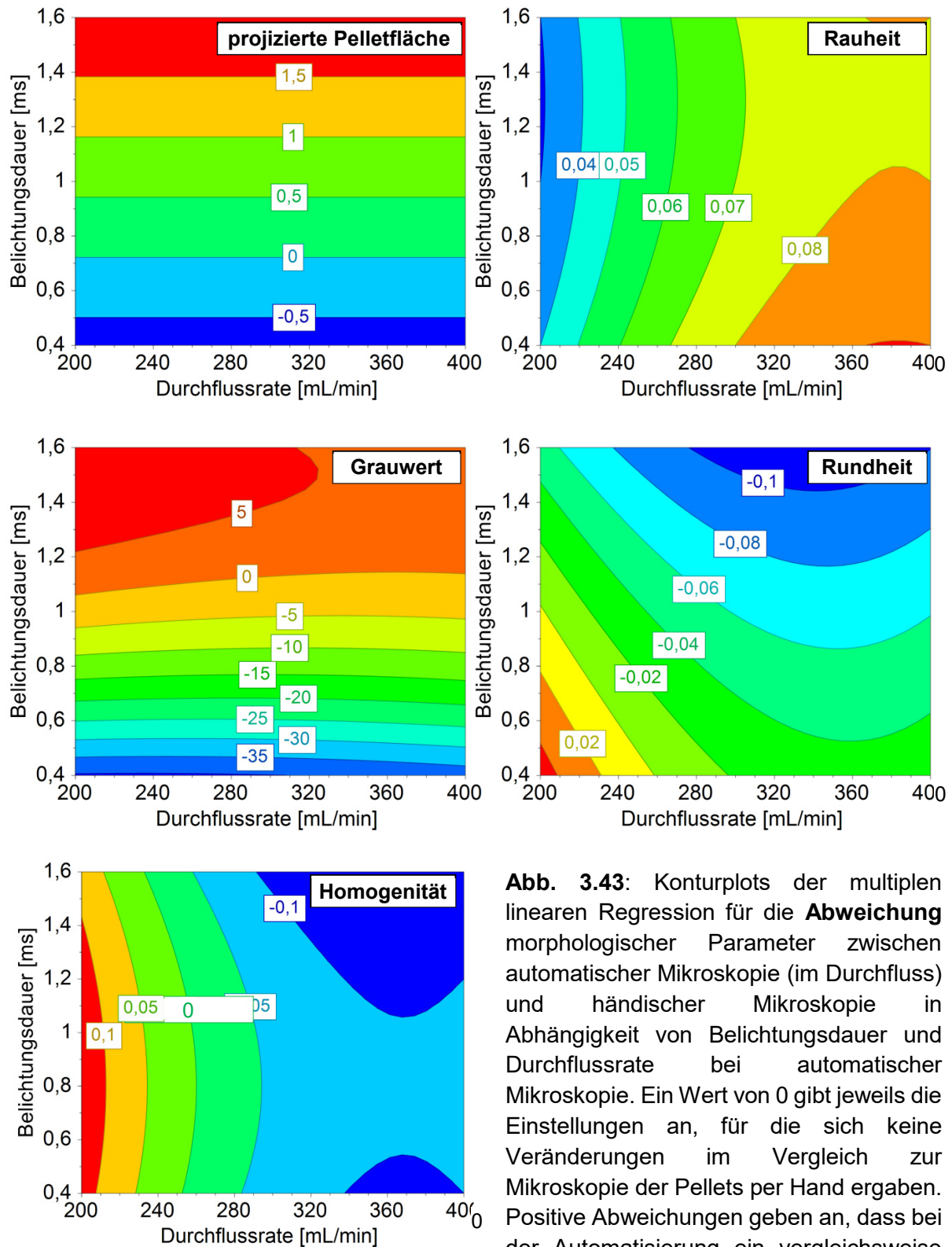
Die Anzahl jeweils detektierter Pellets lag deutlich über der Anzahl an Pellets, die in die morphologische Parameterauswertung einbezogen wurde, da ein Großteil der Pellets den Bildrand schnitt und daher für die Analyse der morphologischen Parameter nicht herangezogen wurde. Für die automatische Bestimmung der Pelletanzahl wurden auch diese Pellets berücksichtigt und nicht nur die zufällig in der Bildmitte befindlichen Pellets. Die Untersuchungen zur Machbarkeit einer automatischen Pelletkonzentrationsbestimmung werden in Kapitel 3.3.2 behandelt.

Für die Machbarkeitsuntersuchungen verwendete Pellets wurden in erster Vorkultur unter den in Tabelle 3.1 beschriebenen Bedingungen angezogen. Die Pellets wurden zunächst per Hand mikroskopiert und anschließend für die Automatisierung verwendet. Dabei wurde untersucht wie die morphologischen Parameter projizierte Pelletfläche, Homogenität, Rauheit, Grauwert und Rundheit sich im Vergleich zum Ergebnis der händischen Mikroskopie veränderten. Nachfolgend dargestellte Abweichungen zwischen den beiden Verfahren sind immer als Differenzwert aus gemessenem Wert der Mikroskopie im Durchfluss abzüglich des Werts, welcher bei Mikroskopie per Hand ermittelt wurde, dargestellt. Alle gemessenen morphologischen Parameter bei jeder Kombination von Belichtungsdauer und Durchflussrate sind in der Tabelle A.7 im Anhang aufgeführt.

Für die mittels MLR berechneten Modelle, die in Abbildung 3.43 für jeden morphologischen Parameter die Abweichung der automatischen Mikroskopie von der händischen Mikroskopie aufzeigen, wurden nur signifikante Faktoren berücksichtigt ( $\alpha=0,20$ ). Alle den in Abbildung 3.43 gezeigten Konturplots zugrunde liegenden Polynome können Tabelle A.8 entnommen werden. Im Anhang sind zudem die Korrelationskoeffizienten  $R^2$  sowie die Vorhersagegüte  $Q^2$  für alle berechneten Modelle dargestellt. Für die morphologischen Parameter wurden hohe bzw. sehr hohe Korrelationskoeffizienten gefunden. Zudem war mit den errechneten Modellen für alle morphologischen Parameter mit Ausnahme der projizierten Pelletfläche eine sehr gute Vorhersage der gemessenen Werte möglich.

In den Konturplots von Abbildung 3.43 können die Einstellungen von Belichtungsdauer und Durchflussrate, bei denen sich keine Veränderungen gegenüber der Mikroskopie der Pellets per Hand ergaben, direkt abgelesen werden (insofern Linie bei Wert von

Null vorhanden). Positive Abweichungen geben an, dass bei der Automatisierung ein vergleichsweise größerer Wert gemessen wurde, als er bei der Mikroskopie per Hand vorlag.



**Abb. 3.43:** Konturplots der multiplen linearen Regression für die **Abweichung** morphologischer Parameter zwischen automatischer Mikroskopie (im Durchfluss) und händischer Mikroskopie in Abhängigkeit von Belichtungsdauer und Durchflussrate bei automatischer Mikroskopie. Ein Wert von 0 gibt jeweils die Einstellungen an, für die sich keine Veränderungen im Vergleich zur Mikroskopie der Pellets per Hand ergaben. Positive Abweichungen geben an, dass bei der Automatisierung ein vergleichsweise größerer Wert gemessen wurde, als bei der Mikroskopie per Hand.

Bei einer Belichtungsdauer von mehr als 0,72 ms nahm die Abweichung der projizierten Pelletfläche von der tatsächlichen Fläche (manuelle Mikroskopie) linear zu. Bei kürzerer Belichtungsdauer nahm sie linear ab. Bei einer im Vergleich zur manuellen Mikroskopie um 0,6 ms verlängerten Belichtungsdauer (1,6 ms) wurde für dieselben Pellets im Durchfluss eine um 2 mm<sup>2</sup> größere projizierte Pelletfläche gemessen. Bei einer Belichtungsdauer von 1 ms war die im automatischen Durchflussverfahren ermittelte projizierte Pelletfläche etwa um 0,6 mm<sup>2</sup> größer als bei der Mikroskopie der Pellets per Hand. Die Durchflussrate hatte keinen signifikanten Einfluss auf die projizierte Pelletfläche. Die positive Abweichung der projizierten Pelletfläche mit zunehmender Belichtungsdauer zeigte sich, da der festgelegte Schwellenwert zur Separation der Pellets vom Hintergrund (binäres Bild) bei der Auswertung mittels ImageJ nicht verändert wurde. Wie auch bei der manuellen Mikroskopie wurde ein konstanter Wert von sieben als Schwellenwert gewählt. Dadurch gewinnen Pellets bei verlängerter Belichtung im Außenbereich an Fläche hinzu. Dabei werden ggf. auch nicht mehr einem Pellet zugehörige Bereiche (Verschmutzungen, etc.) zu dessen projizierter Pelletfläche hinzugezählt. Bei niedrigen Belichtungsdauern hingegen verringerte sich die gemessene Fläche, da die weniger dicht gewachsenen Pelletaußenbereiche aufgrund der geringeren Belichtung einen Grauwert unterhalb des Schwellenwerts aufwiesen und somit nicht mehr der projizierten Fläche hinzugerechnet wurden. Außergewöhnlich war jedoch, dass für die automatisch mikroskopierten Pellets tendenziell eher größere projizierte Pelletflächen gemessen wurden und keine Abhängigkeit von der Durchflussrate bestand. Angenommen wurde ursprünglich ein umgekehrtes Verhalten, da vermutet wurde, dass sich die meist ellipsenförmigen Pellets in Bewegung nicht wie in der Petrischale entlang ihrer breiten Seite, sondern auch an ihrer schmalen Seite ausrichten könnten, wodurch eine geringere projizierte Pelletfläche gemessen würde. Dies trat bei den untersuchten Förderraten offensichtlich nicht auf.

Die Pelletrauheit war bei niedrigen Durchflussraten nur wenig gegenüber der Rauheit, die bei Mikroskopie per Hand festgestellt wurde, verändert. Die Rauheit war bei einer Durchflussrate von ca. 200 mL/min um 0,03 bis 0,04 verringert. Hauptsächlich die Veränderung der Durchflussrate führte dazu, dass die Pelletrauheit in der automatischen Mikroskopie divergierte. Der Rauheitswert war bei hoher Förderrate der Pumpe fast um 0,1 erhöht. Bei der automatischen Mikroskopie wurden die Pellets somit entsprechend weniger rau abgebildet.

Diese Veränderung bei hoher Durchflussrate wurde erwartet, da die Pellets aufgrund ihrer schnelleren Bewegung durch die Durchflussküvette nicht mehr mit sehr hoher Auflösung im Randbereich dargestellt werden konnten. Die Konturen verschwammen letztlich etwas bzw. wurden unschärfer abgebildet. Zudem legten sich Hyphenfortsätze im Randbereich der Pellets aufgrund der Strömung etwas an die Pelletoberfläche an, sodass Pellets mit diesen Strukturen weniger rau erschienen. Bei Erhöhung der Belichtungsdauer von 0,4 auf etwa 1,2 ms verringerte sich die Abweichung der gemessenen Pelletrauheit etwas. Bei weiterer Erhöhung der Belichtungsdauer stieg sie wieder geringfügig an.

Der mittlere Grauwert war zufolge des berechneten Modells bei einer Belichtungsdauer von 1 ms bei der Automatisierung geringfügig verringert. Diese marginale Verringerung des mittleren Grauwerts bei der Automatisierung bei gleicher Einstellung der Belichtungszeit wie bei der händischen Mikroskopie in einer Petrischale (ohne Deckel) könnte dadurch zustande kommen, dass die zusätzlichen Glasflächen der Küvette im Strahlengang die Menge an durchstrahlendem Licht verringerten, da die Strahlen gebrochen bzw. reflektiert wurden. Des Weiteren zeigte der Grauwert mit zunehmender Belichtungsdauer eine leicht positive Abweichung, sank bei Verringerung der Belichtungsdauer jedoch deutlich ab. Die mit zunehmender Belichtungsdauer ( $> 1$  ms) nur geringfügig höher ausfallenden Grauwerte waren darauf zurückzuführen, dass nur die äußeren Bereiche der Pellets noch deutlich höhere Grauwerte erreichen konnten, wohingegen die großen Flächenanteile in der Mitte der Pellets bereits als homogene weiße Fläche (hohe Grauwerte) abgebildet wurde. In diesem Bereich konnten kaum noch höhere Grauwerte erreicht werden. Die Pixel waren gewissermaßen mit hohen Grauwerten gesättigt. Wurde die Belichtungsdauer hingegen verringert, zeigte sich der umgekehrte Effekt und der mittlere Grauwert der Pellets sank sehr deutlich ab, da nun die große Pelletfläche in der Mitte der Pellets der maßgeblich von Veränderungen betroffene Bereich war. Die Durchflussrate hatte wie erwartet kaum einen Einfluss.

Die Rundheit der Pellets wich bei einer Belichtungsdauer von 1 ms und einer Durchflussrate von 200 mL/min nicht von den bei Mikroskopie per Hand gemessenen Werten ab. Mit steigender Durchflussrate wurden bei der automatischen Bildaufnahme geringere Werte für die Rundheit der Pellets gemessen. Dies galt auch für die Erhöhung der Belichtungsdauer bei Durchflussraten größer als 260 mL/min. Ründere Pellets als händisch in der Petrischale gemessen, wurden hingegen bei

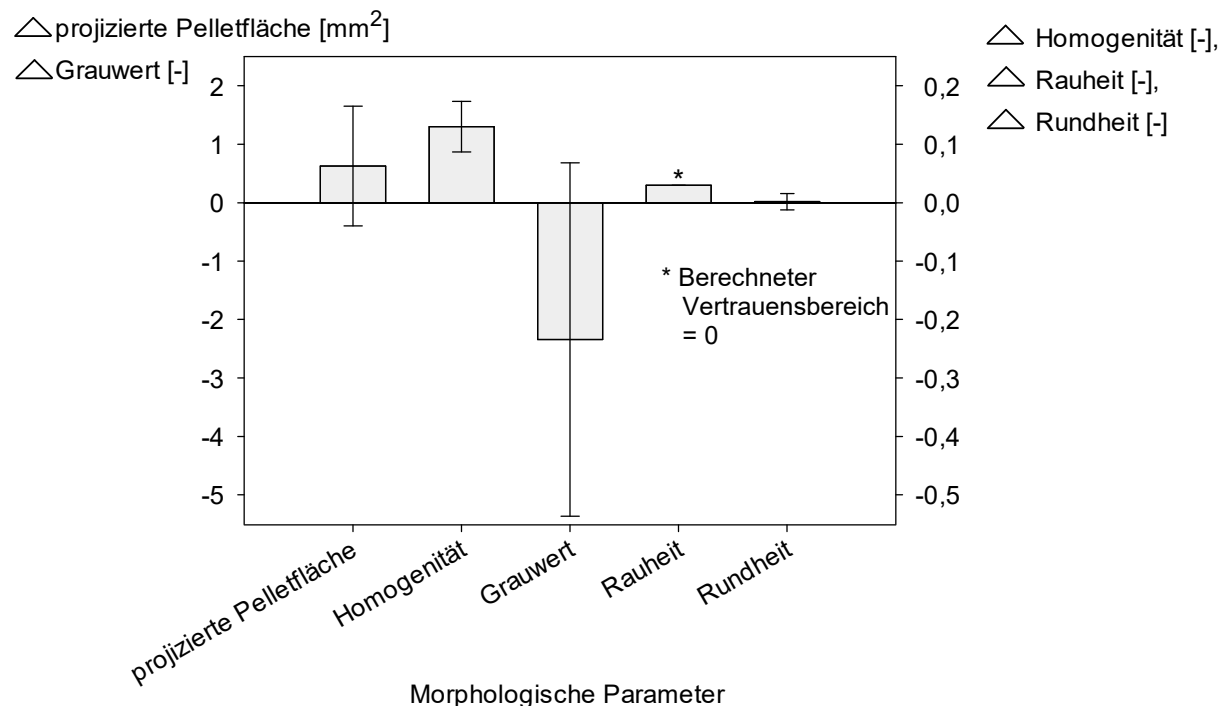
Belichtungsdauern unter 1 ms und geringen Durchflussraten ( $< 260$  mL/min) gemessen. Die maximale Verringerung der Rundheit trat bei einer Durchflussrate von 339 mL/min und einer Belichtungsdauer von 1,6 ms auf. Mit zunehmender Durchflussrate wurden geringere Werte für die Rundheit gemessen, da die Pellets dann durch die schnellere Bewegung in eine Richtung während der Aufnahme leicht verwischt und damit länglicher dargestellt wurden. Dieser Effekt wurde durch höhere Belichtungsdauern noch verstärkt. Die Messung von im Vergleich zur händischen Mikroskopie runderen Pellets bei Belichtungsdauern unter 1 ms und langsamem Durchfluss ( $< 260$  mL/min) liegt vermutlich darin begründet, dass im Außenbereich vorhandene Hyphenfortsätze, welche den Parameter Pelletrundheit ebenfalls leicht beeinflussen können, dann nicht mehr vollständig abgebildet wurden.

Die Homogenität der Pelletgrößenverteilung lag bei einem Durchfluss zwischen 233 und 260 mL/min über alle aufgenommenen Belichtungsdauern im Bereich der per Hand mikroskopierten Pellets. Bei einer geringen Durchflussrate (von 200 mL/min) war die Homogenität bei der automatischen Mikroskopie nur leicht erhöht. Die gemessenen Unterschiede in der Homogenität der Pelletgrößenverteilung waren allgemein sehr gering. Auffällig ist, dass die Änderung der gemessenen Differenzen in der Homogenität zwischen den beiden Verfahren bei hohen Durchflussraten sehr gering wurde. So war bei einer Erhöhung der Durchflussrate von 300 auf 400 mL/min kaum eine Veränderung in der Homogenität der Pelletgrößenverteilung festzustellen. Dies zeigt, dass bei dem gewählten Versuchsaufbau keine Selektion von Pellets stattfand. Jedoch wurde mit verringerten Förderraten eine etwas deutlicher ausfallende Veränderung der Abweichung in Richtung höherer Homogenitäten festgestellt, was darauf hindeutet, dass hier eine Selektion von Pellets bestimmter Größe stattgefunden haben könnte. Die beobachteten Abweichungen waren in dem untersuchten Bereich jedoch sehr gering.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Abweichung zwischen beiden Verfahren für die morphologischen Parameter der Pellets bei einem Durchfluss von 200 mL/min und einer Belichtungsdauer von 1,0 ms. Diese Einstellung wurde gewählt, da hier nur geringe Abweichungen zwischen beiden Verfahren für die meisten der morphologischen Parameter bestanden. Bei diesen Einstellungen wurde somit ein potentiell optimaler Betriebspunkt der automatischen Pelletmikroskopie evaluiert. Zwar lag bezüglich der projizierten Pelletfläche die geringste Abweichung bei einer Belichtungsdauer von letztlich 0,7 ms vor, jedoch war diese Belichtungsdauer an der

Kamera nicht einstellbar, da nur gerade Nachkommastellen ausgewählt werden können. Zudem würden für die Pellets bei dieser Parametereinstellung deutlich verringerte Grauwerte ermittelt werden. Für die projizierte Fläche der Pellets konnte ferner aufgrund der relativ geringen Vorhersagegüte des Modells keine sehr präzise Aussage über die tatsächlich bestehende Abweichung zwischen den beiden Verfahren getroffen werden.

Abbildung 3.44 zeigt auf, mit welcher Genauigkeit die Werte unter Einbeziehung des Modellfehlers vorhergesagt werden können.



**Abb. 3.44:** Abweichungen für morphologischen Parameter von *S. commune* zwischen mittels Zeitreihenaufnahmen und per Hand aufgenommenen Pellets, wenn eine Belichtungsdauer von 1,0 ms und eine Förderrate der Pumpe von 200 mL/min eingestellt wurden. Berechnung auf Grundlage der mittels multipler linearer Regression ermittelten Polynome (Tab. A.8). Die Mikroskopie per Hand erfolgte nicht im Durchfluss; sie wurde bei einer Belichtungsdauer von 1,0 ms vorgenommen.

Bei den gewählten Parametereinstellungen wurde vom Modell eine um ca. 0,63 mm<sup>2</sup> größere projizierte Pelletfläche vorhergesagt, als sie in Realität (manuelle Mikroskopie) vorlag. Dieser Wert war jedoch nicht genau vorherzusagen, da keine validen Modelle, die einen größeren Anteil der in den Daten liegenden Varianz beschreiben, gefunden werden konnten. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 könnte die Abweichung (bei 1 ms und 200 mL/min) auch bis zu maximal +1,66 mm<sup>2</sup> oder -0,40 mm<sup>2</sup> betragen. Genauso gut könnte jedoch auch gar keine Abweichung zwischen beiden Verfahren

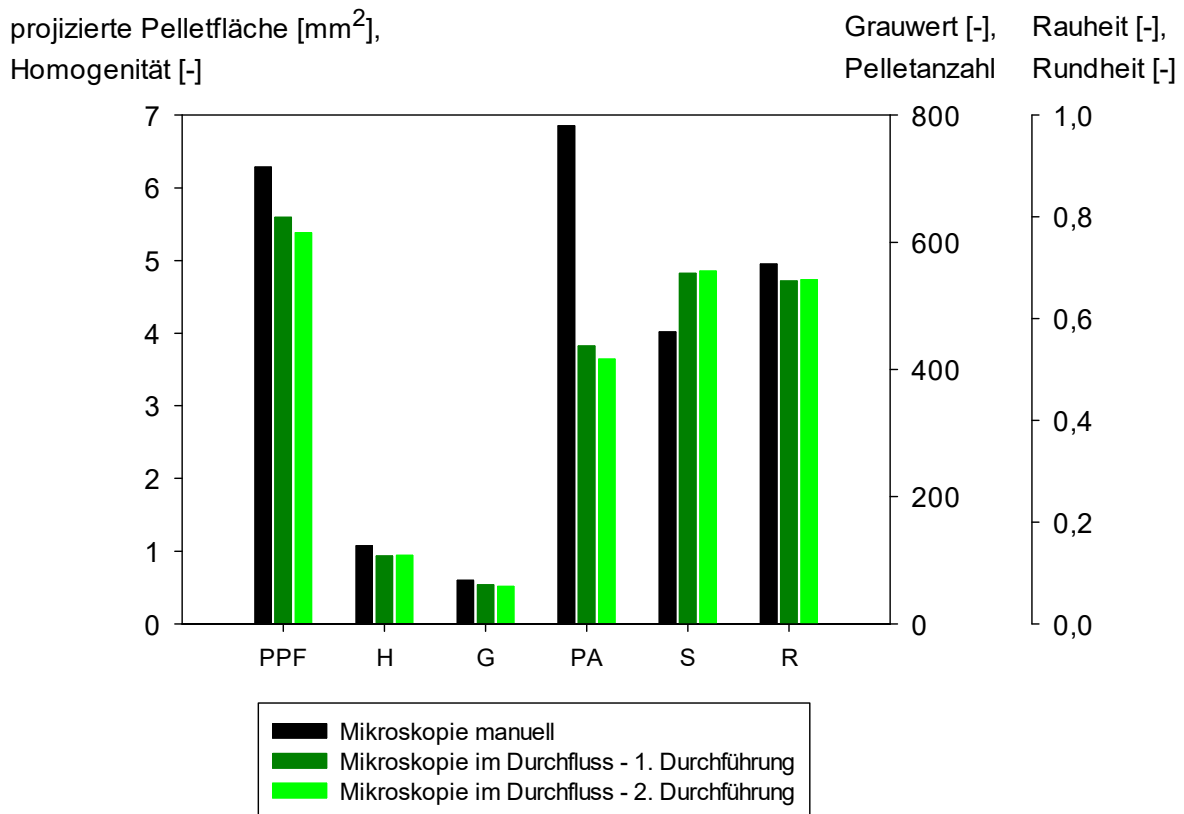
vorliegen. Die relativ geringe Vorhersagegüte des Modells (zudem Streuung der Messwerte etwas größer;  $R^2 = 0,7$ ) könnte durch mehr analysierte Pellets erhöht werden. Dazu muss die Zeitreihenaufnahme verlängert werden und/oder die Pelletkonzentration erhöht werden.

Die Homogenität war bei den gewählten Einstellungen der automatischen Bildaufnahme im Durchfluss nur geringfügig gegenüber der Mikroskopie per Hand erhöht. Die Abweichung der Homogenität konnte mit sehr großer Genauigkeit vorhergesagt werden. Der mittlere Grauwert wich bei den Einstellungen ein wenig nach unten ab. Ähnlich wie für die projizierte Pelletfläche konnte dieser Wert jedoch nicht sehr präzise vorhergesagt werden. Die Rauheit war bei Mikroskopie im Durchfluss etwas verringert, gleichzeitig war die Rundheit unverändert. Das Modell erlaubte bei den gewählten Parametereinstellungen eine sehr präzise Angabe für die Abweichung von der tatsächlichen Rauheit. Auch die Angabe der Abweichung der Rundheit war mit nur sehr geringen Unsicherheiten behaftet.

Bei den Auswertungen, die den gezeigten Untersuchungen zu Grunde lagen, wurden keine zusammenhängenden Pellets, welche die Werte für die morphologischen Parameter verfälschen würden, gefunden. Daher war es möglich die Pelletkonzentration weiter zu erhöhen, um die Analysezeit zu reduzieren und/oder die statistische Stichhaltigkeit noch zu verbessern. Zur Berechnung der Konturplots wurden in der automatischen Bildaufnahme in dem Durchflussverfahren jeweils knapp 150 Pellets in jeweils 7,4 min aufgenommen. Einschließlich Vorbereitung der Proben bedeutete dies eine Reduktion des zeitlichen Aufwands um den Faktor 5 gegenüber der manuellen Mikroskopie. In wie weit die Pelletkonzentration in der Suspension des Vorlagegefäßes noch erhöht werden kann, um die Analysedauer weiter zu verringern, wird im nachfolgenden Unterkapitel erläutert.

### **3.3.1 Validierung und Optimierung der Automatisierung**

Zur Validierung der automatischen Mikroskopie im Durchfluss wurden weitere Pellets aus erster Vorkultur zunächst manuell und anschließend im Durchflussverfahren mikroskopiert. Für die Untersuchungen wurden weniger verdünnte Suspensionen eingesetzt bzw. bei höheren Pelletkonzentrationen mikroskopiert.



**Abb. 3.45:** Validierungsversuch zur automatischen Mikroskopie für die Bestimmung makromorphologischer Parameter (projizierte Pelletfläche (PPF), Homogenität (H), Grauwert (G), Pelletanzahl (PA), Rauheit (S), Rundheit (R)) von *S. commune*. Ergebnisse aus manueller Mikroskopie im Vergleich zu gemessenen Werten im Durchflussverfahren bei den als optimal definierten Bedingungen, bei denen die gemessenen Abweichung zwischen beiden Verfahren minimal sind (Belichtungsdauer: 1ms; Durchflussrate: 200 mL/min).

Es wurden 780 Pellets aus erster Vorkultur zunächst manuell mikroskopiert und die makromorphologischen Parameter ausgewertet. Die Ergebnisse sind im jeweils linken Balken von Abbildung 3.45 dargestellt. Anschließend wurden diese Pellets in der Durchflussmikroskopie mittels Zeitreihenaufnahmen mikroskopiert. Die Mikroskopie im Durchflussverfahren wurde zweimal durchgeführt. Die projizierte Pelletfläche war im Validierungsversuch etwas gegenüber den bei manueller Mikroskopie bestimmten Flächen verringert. Sie befand sich noch in etwa im Bereich durch das Modell vorhergesagter Abweichungen. Die Vorhersage für die Fläche war mit Hilfe des Modells zudem nicht sehr genau möglich (Abb. A.21).

Die Homogenität war kaum verändert. Somit lag keine Selektion bestimmter Pelletgrößen vor. Auch der Grauwert war nur wenig verändert.

Die Rauheit verringerte sich, wie auch auf Grundlage des erstellten CCF-Modells beschrieben, etwas. Die Rundheit der Pellets stellte sich bei Mikroskopie im Durchfluss kaum verändert dar. Eine ähnlich geringe Abweichung für diesen Parameter wurde



auch bei Auswertung der statistischen Versuchsplanung ermittelt (vgl. Abb. 3.45 und 3.43).

Der Vergleich beider Versuchsdurchläufe im Durchflussverfahren ergab, dass sich für alle makromorphologischen Parameter außer der Rauheit jeweils äußerst ähnliche Werte zeigten. Die Reproduzierbarkeit des Verfahrens war somit gegeben.

Um die Grenzen des Verfahrens zu testen, wurden für die Validierung größere und rauere Pellets ausgewählt. Es wurden somit nicht dieselben Pellets wie in der statistischen Versuchsplanung eingesetzt und zudem war die Pelletkonzentration nicht gleich. Daher dürfen die Ergebnisse der Validierung nicht direkt mit den Modellen, die in den Konturplots in Abbildung 3.43 dargestellt sind, verglichen werden. In dem beschriebenen Validierungsversuch wurde eine höhere Pelletkonzentration getestet (Grenzbereich auf den sie in etwa maximal erhöht werden sollte, vergleiche dazu Abbildung 3.46.A), um herauszufinden in wie weit damit die Dauer der Bildaufnahme bis zu der 150 Pellets aufgenommen werden, noch gesenkt werden konnte und gleichzeitig, ob bei der höheren Pelletkonzentration auch noch ähnliche Werte für die morphologischen Parameter erzielt werden können.

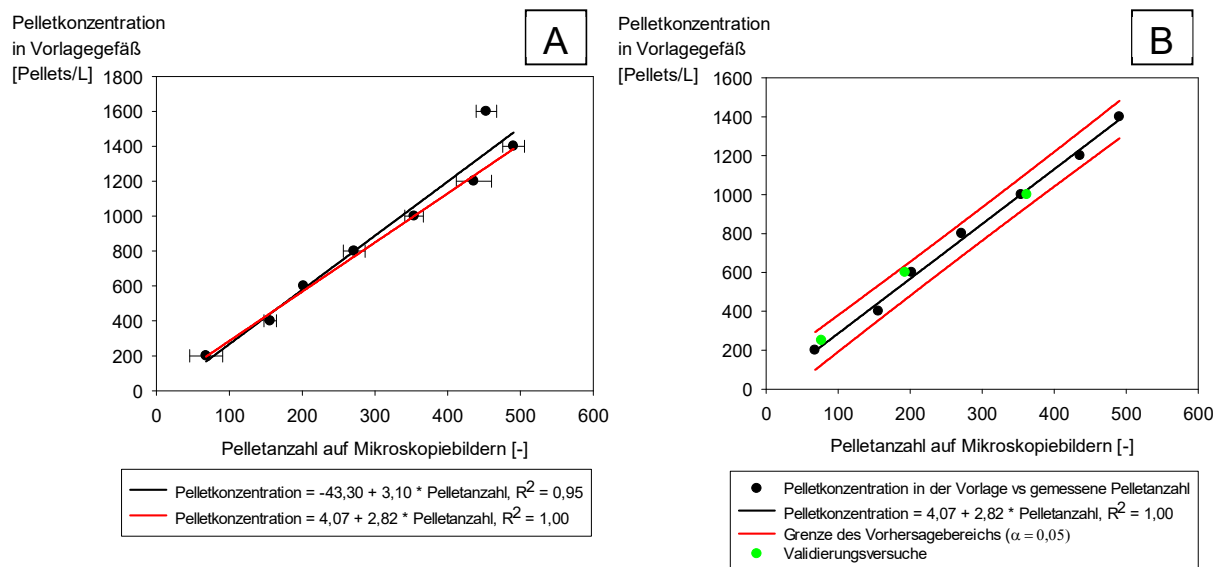
Es zeigte sich, dass bei einer derart hohen Pelletkonzentration in der Vorlage (1560 Pellets/L) bis zu 437 Pellets in 7,4 min aufgenommen und zur Auswertung der Bildanalyse zugeführt werden konnten. Mit diesem hohen Durchsatz konnten der Stichprobenumfang und damit die statistische Aussagekraft der Analyse deutlich erhöht werden bzw. die Analysedauer gesenkt werden. Für die Mikroskopie von 150 Pellets wurden demnach nur noch 2,5 min benötigt. Das automatisierte Verfahren zur Mikroskopie der Pellets von *S. commune* bewirkte somit eine deutliche Reduktion des personellen und zeitlichen Aufwands und lieferte im Vergleich mit der manuellen Mikroskopie sehr ähnliche Ergebnisse. Der zeitliche Aufwand reduzierte sich in etwa um das 15-fache. Abweichungen des Verfahrens konnten mit statistischer Versuchsplanung berechnet werden, sodass eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse aus automatischer Mikroskopie möglich war.

### 3.3.2 Automatisierung der Pelletkonzentrationsbestimmung

Im vorangegangenen Kapitel wird die Mikroskopie von Pellets im Durchfluss mit der manuellen Mikroskopie derselben Pellets verglichen. Sich für die verschiedenen makromorphologischen Parameter ergebende Abweichungen zwischen beiden Verfahren wurden mittels multipler linearer Regression aufgedeckt.

Zusätzlich zur Untersuchung der Automatisierung mit dem Ziel die Morphologie von *S. commune* möglichst schnell erfassen zu können, wurde dasselbe Verfahren auf die Machbarkeit einer automatischen Pelletkonzentrationsbestimmung hin untersucht, die gleichzeitig erfolgen kann. Daher wurde bei den Einstellungen mit nur geringer Abweichung zwischen automatischer und manueller Mikroskopie (Belichtungsdauer: 1ms; Durchflussrate: 200 mL/min), die somit für die automatische Messung zu empfehlen sind, auch die Möglichkeit zur automatischen Pelletkonzentrationsbestimmung untersucht. Es wurde geprüft in welchem Bereich eine lineare Abhängigkeit zwischen den aufgenommenen Pellets (ausschließlich Berücksichtigung von Pellets, die nicht den Bildrand schnitten) und der tatsächlichen Pelletkonzentration in der Suspension der Vorlage bestand. Vor Versuchsdurchführung wurde angenommen, dass bei hoher Konzentration in der Vorlage durch potentiell mehr zusammenhängende Pellets eine verminderte Anzahl an Pellets auf den Bildern vorgetäuscht wird und somit Abweichungen von der linearen Abhängigkeit bei geringeren Konzentrationen auftreten.

Vom Bildverarbeitungsprogramm ImageJ wurde bei den voll-automatischen Bildanalysen die Anzahl an Pellets angegeben, die nicht den Bildrand schnitten. Diese auf den automatisch gemachten Aufnahmen ermittelte Anzahl wurde gegen die bekannte Pelletkonzentration aufgetragen, die in den Vorlagebehälter gegeben wurde (Abb. 3.46). Annähernd für den gesamten Konzentrationsbereich konnte ein linearer Zusammenhang ermittelt werden. Bei der höchsten vorgelegten Pelletkonzentration von 1600 Pellets je Liter jedoch war eine deutliche Abweichung zu erkennen. Insbesondere für die Konzentration von 1600 Pellets/L wurden auf den Bildern einige zusammenhängende Pellets detektiert. Dabei wurden zum Teil drei oder sogar vier Pellets als Einzelpellets detektiert. Somit sollten Pellets aus erster Vorkultur unter eine Pelletkonzentration von 1600 Pellets/L verdünnt werden, um eine exakte Pelletkonzentrationsbestimmung zu ermöglichen. Hierzu kann der lineare Zusammenhang, der in Abbildung 3.46 in rot dargestellt ist, verwendet werden.



**Abb. 3.46:** Pelletkonzentration im Vorlagegefäß in Abhängigkeit der Pelletanzahl auf automatisch aufgenommenen Bildern der Mikroskopie im Durchflussverfahren. Ausgleichgerade unter Berücksichtigung aller Pelletkonzentrationen (schwarz) bzw. ohne Berücksichtigung der Pelletkonzentration von 1600 Pellets/L im Vorlagegefäß (rot) (A). Vorhersagebereich der Regression mit Eintragung von Ergebnissen aus drei Validierungsversuchen (B).

Zu Validierungszwecken wurden drei unterschiedlich verdünnte Pelletsuspensionen aus erster Vorkultur durch die Küvette gepumpt. Abbildung 3.46.B zeigt, dass alle Auftragungen der ermittelten Pelletanzahl auf den Bildern gegen die Pelletkonzentration im Vorlagegefäß innerhalb des Vertrauensbereichs lagen. Das Verfahren zur automatischen Pelletkonzentrationsbestimmung konnte somit innerhalb der gesetzten Grenzen erfolgreich validiert werden.

Mit der gleichzeitig ausführbaren Pelletkonzentrationsbestimmung konnte eine weitere deutliche Reduktion des manuellen Aufwands erzielt werden.

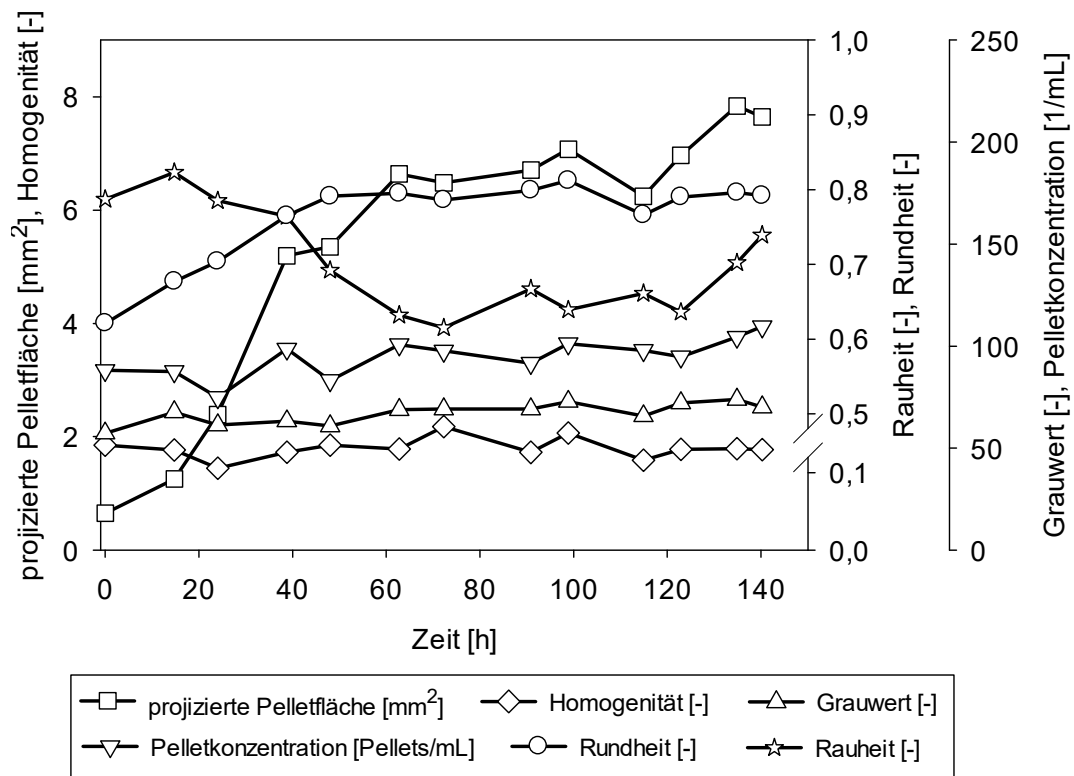
### 3.4 Kinetik der morphologischen Entwicklung

Morphologische Parameter von *S. commune* wurden in verschiedenen Kultivierungsverläufen untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden zusätzlich dazu verwendet die Konzentration der Biotrockenmasse mit Hilfe der Morphologie über den gesamten Kultivierungsverlauf hinweg zu berechnen. Auch ein Vergleich der zeitlich abhängigen morphologischen Entwicklung mit der Produktivität im Kultivierungsverlauf wurde vorgenommen. Ziel dieser Untersuchungen war es Korrelationen zwischen Morphologie und Produktivität aufzudecken, mit deren Hilfe

beispielsweise frühzeitig eine verminderte Produktivität erkannt werden kann, sodass weitere Maßnahmen ergriffen werden können, um den Produktionsprozess zeit- und ressourcensparend gestalten zu können.

### **3.4.1 Morphologische Parameter im Kultivierungsverlauf**

Die Änderung der morphologischen Parameter von *S. commune* im Kultivierungsverlauf ist nachfolgend am Beispiel einer Kultivierung im Reaktormaßstab (30 L) gezeigt, die mit ganzen Pellets beimpft wurde (Abb. 3.47). Die projizierte Pelletfläche nahm, von Beginn der Kultivierung an, zu. Sie stieg bis auf einen Wert von etwa 7 mm<sup>2</sup> nach 63h an und veränderte sich anschließend kaum noch. Die Pelletrauheit lag zu Beginn der Kultivierung bei einem Wert von etwa 0,8. Nach 39 h sank der Rauheitswert in der Reaktorkultivierung ab, d.h. die Pelletoberfläche wurde rauer. In der Folge schwankte die Rauheit um einen Wert von 0,65. Gegen Ende der Kultivierung wurden die Pellets wieder etwas glatter. Die Pellets wurden von Kultivierungsbeginn an stetig runder, d.h. der Wert der Pellet-rundheit nahm zunächst linear zu und stagnierte ab etwa 44 h Kultivierungsdauer bei einem Wert von 0,8. Die Homogenität der Pelletgrößenverteilung schwankte während der gesamten Kultivierungsdauer etwas. Er lag durchschnittlich bei einem Wert von etwa 1,8. Der Grauwert der Pellets lag bei einem Wert von 70 und blieb über die gesamte Kultivierungsdauer nahezu unverändert. Die Pelletkonzentration veränderte sich kaum. Sie lag zwischen 80 und 100 Pellets je Milliliter Kultursuspension. Am Ende der Kultivierung lagen Konzentrationen von knapp über 100 Pellets/mL vor.



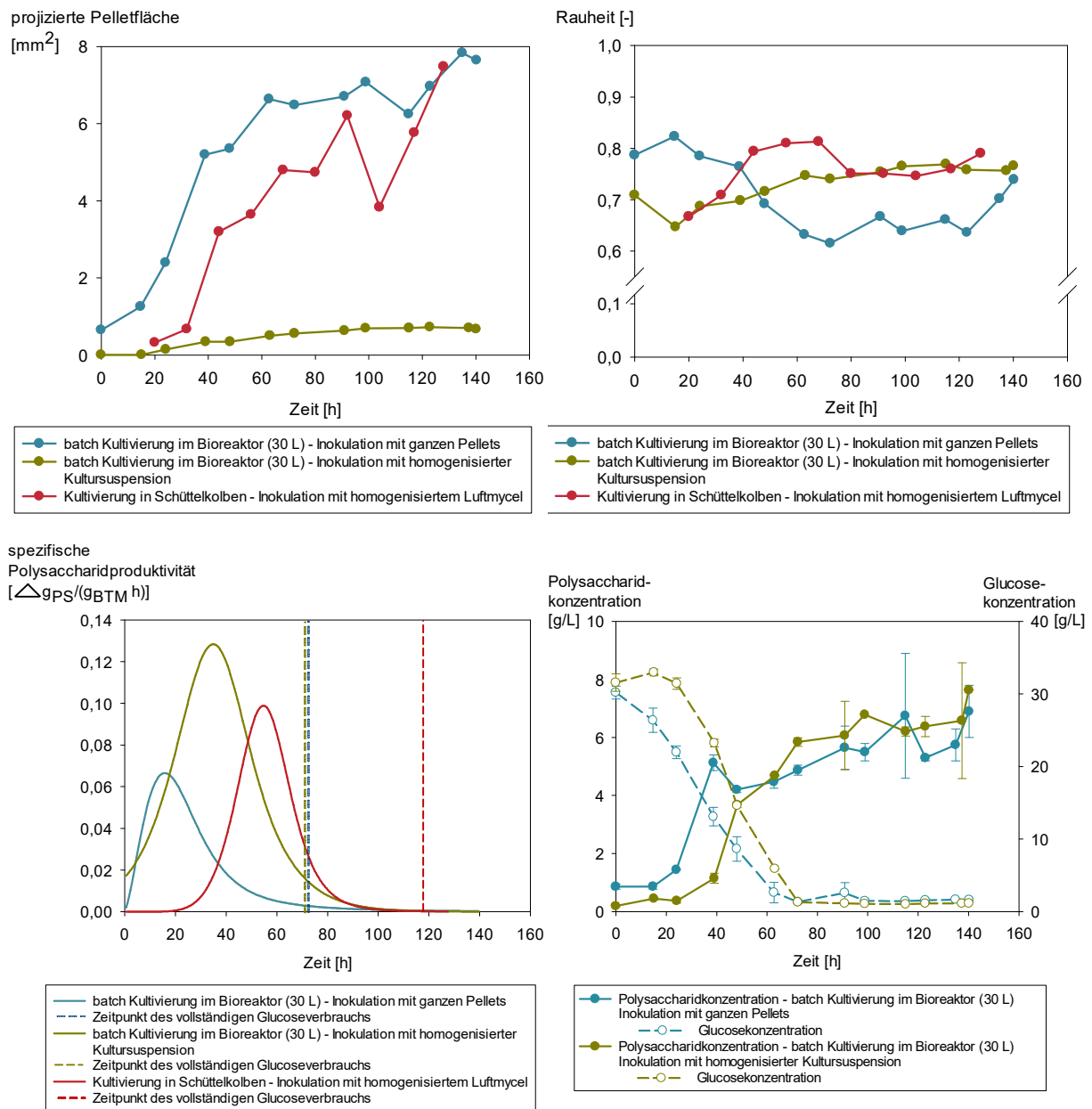
**Abb. 3.47:** Morphologische Parameter bei Kultivierung von *S. commune* im batch-Verfahren im 30 L Bioreaktor. Es wurde mit nicht-homogenisierter Kultursuspension beimpft.

Zu Abbildung 3.47 zugehörige Aufnahmen aus der Mikroskopie der Pellets sind exemplarisch in Abbildung A.22 im Anhang dargestellt.

Weitere Untersuchungen zielten auf den Zusammenhang zwischen Änderung der Morphologie und gleichzeitiger Veränderung der konventionell etablierten Kultivierungsparameter (Konzentration der Biotrockenmasse, Polysaccharidkonzentration und Glucosekonzentration) ab. In den nachfolgenden Kapiteln wird insbesondere die Entwicklung der Produktivität und der Biotrockenmassekonzentration mit der zeitabhängigen Änderung der morphologischen Parameter verglichen.

### 3.4.2 Vergleich von Produktivität und Morphologie

In diesem Kapitel wird der Zusammenhang zwischen der Produktbildung und morphologischen Parametern im Kultivierungsverlauf von *S. commune* betrachtet. Dazu sind in Abbildung 3.48 die projizierte Pelletfläche, die Pelletrauheit und die spezifische Polysaccharidbildung im Kultivierungsverlauf von drei unterschiedlichen Kultivierungen im batch-Verfahren dargestellt.



**Abb. 3.48:** Projizierte Pelletfläche (oben links) und Rauheit (oben rechts) der Pellets von *S. commune* im Verlauf verschiedener Kultivierungsprozesse sowie die jeweils zugehörige spezifische Produktivität (unten links). Zusätzlich sind für die Kultivierungen im Reaktormaßstab die Glucose- und Polysaccharidkonzentrationen dargestellt (unten rechts).

Bei Überschreiten einer projizierten Pelletfläche von etwa 5 mm<sup>2</sup> nahm die Rauheit der Pellets zu (Abb. 3.48 rechts oben). Gleichzeitig nahm zu diesem Zeitpunkt die spezifische Produktivität bereits deutlich ab, obwohl noch ausreichend Glucose vorlag. Der direkte Vergleich von zwei Kultivierungen, von denen eine mit ganzen Pellets und eine weitere mit homogenisierter Kultursuspension beimpft wurde, zeigt, dass trotz gleichem Zeitpunkt der Glucoselimitierung nach 72 h die spezifische Produktivität für das Polysaccharid in der Kultivierung mit den deutlich größeren Pellets bereits deutlich

früher zurück ging (Abb. 3.48 rechts unten). Die Produktivität brach stark ein, nachdem die Pellets eine projizierte Pelletfläche von 5 mm<sup>2</sup> erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt (nach etwa 40 h) nahm auch die Rauheit der Pellets deutlich zu. Wurde mit homogenisierter Kultursuspension beimpft, so entstanden deutlich kleinere Pellets, deren Rauheit zu Kultivierungsbeginn etwas abnahm, sich im weiteren Kultivierungsverlauf nach 48 h aber kaum noch veränderte. Die spezifische Produktivität ging erst mit einsetzender Glucoselimitierung deutlich zurück. In dieser Kultivierung wurde zudem eine deutlich höhere spezifische Produktivität verzeichnet, als bei Beimpfen mit ganzen Pellets. In Übereinstimmung mit der Reaktorkultivierung, die mit ganzen Pellets beimpft wurde und in deren Verlauf entsprechend große Pellets gebildet wurden, konnte auch im Kultivierungsverlauf einer Schüttelkolbenkultivierung bei Überschreiten einer projizierten Pelletfläche von 5 mm<sup>2</sup> eine Zunahme der Pelletrauheit beobachtet werden, mit der ein starker Rückgang der spezifischen Produktivität assoziiert war. Glucoselimitierung trat hier ebenfalls erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt in der Kultivierung auf.

Für jede Probe des Kultivierungsverlaufs der mit ganzen Pellets beimpften Reaktorkultivierung ist die Pelletrauheit in Abhängigkeit der projizierten Pelletfläche für alle mikroskopisch untersuchten Einzelpellets in Abbildung A.23 dargestellt. Darauf ist zu erkennen, dass Pellets kleiner 5 mm<sup>2</sup> meist eine Rauheit um etwa 0,8 aufwiesen. Ab ca. 4,5 mm<sup>2</sup> wiesen viele Pellets einen deutlich niedrigeren Rauheitswert (0,5) auf. Sie besaßen also eine rauere Oberfläche als die kleinen Pellets. Ab einer Fläche von ca. 6 mm<sup>2</sup> nahm die Oberflächenrauheit mit zunehmender Größe stetig wieder etwas ab. Einen Wert von 0,8 hatten jedoch erst wieder sehr große Pellets mit einer projizierten Fläche ab etwa 15 mm<sup>2</sup>. Exemplarische Mikroskopieaufnahmen der Proben aus allen drei Kultivierungen, die in Abbildung 3.48 dargestellt sind, können den Abbildungen A.22, A.24 und A.25 entnommen werden. Auf den Aufnahmen ist zu erkennen, dass das Auftreten von im Randbereich der Pellets hervortretenden Hyphenbündeln, die Ursache für den verringerten Rauheitswert (erhöhte Rauheit der Pellets) im Kultivierungsverlauf war. Nach 104 h lösten sich insbesondere in der Schüttelkolbenkultivierung die Hyphenfortsätze im Randbereich teilweise ab, wodurch der Rauheitswert wieder etwas anstieg (Abb. 3.48 rechts oben) und die Werte für die durchschnittlich projizierte Pelletfläche kurzzeitig absanken (Abb. 3.48 links oben) während die Biomasse noch weiter zunahm (Daten nicht gezeigt).

Als zusätzliche morphologische Untersuchung wurde auch die durchlässig erscheinende Pelletfläche (im Außenbereich der Pellets) betrachtet, um aufzuklären, ob ein Einfluss der Pelletdichte im Außen- bzw. Randbereich auf das Produktivitätsverhalten der Pellets bestand. Dazu wurde von der projizierten Pelletfläche, die standardmäßig bei einem Schwellenwert von 7 für den Grauwert ermittelt wird, die Fläche abgezogen, die bei einem Schwellenwert von 100 noch verbleibt. Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass trotz unveränderter Fläche des durchlässig erscheinenden Pelletbereichs ein Einbruch der spezifischen Produktivität zu beobachten war. Eine Erhöhung der Pelletdichte im Randbereich, die zu einer verminderten Versorgung der Pellets führen könnte, wurde somit ausgeschlossen. Vielmehr scheinen die Pellets aufgrund der vergrößerten Rauheit selbst und/oder aufgrund des Überschreitens eines bestimmten Grenzwertes der Pelletgröße (etwa 5 mm<sup>2</sup>) in einen weniger produktiven Zustand überzugehen. Die auf das Pelletvolumen bezogene Menge an gebildetem Polysaccharid ging bereits bevor der äußere durchlässige Pelletbereich die größte Ausdehnung erreichte wieder zurück (Tab. A.9).

Aus dem in den Reaktorkultivierungen gemessenen Sauerstoffpartialdrücken wurde kein Zusammenhang zwischen potentiellen Sauerstofflimitierungen und dem Einbruch der spezifischen Produktivität gefunden. Zwar fiel die plötzlich verminderte Abnahme in der Sauerstoffsättigung nach 40 h in der Kultivierung mit ganzen Pellets mit dem Einbruch der Produktivität zusammen (pO<sub>2</sub> von etwa 15 %), jedoch zeigte der pO<sub>2</sub>-Verlauf in der Reaktorkultivierung mit den kleinen Pellets ein sehr ähnliches Verhalten, ohne dass es zu einem Einbruch bei der Produktivität kam. Die Produktivität nahm sogar erst deutlich zu, nachdem der pO<sub>2</sub> unter etwa 10 % (v/v) gefallen war. Die Parameter Biotrockenmasse-, Polysaccharid- und Glucosekonzentration sowie die projizierte Pelletfläche und der pO<sub>2</sub>-Wert sind für die zwei verschiedenen Reaktorkultivierungen jeweils über den gesamten Kultivierungsverlauf (30 L-Maßstab) in Abb. A.26 und A.27 dargestellt.

Da bei Untersuchung der Morphologie im Kultivierungsverlauf auffiel, dass die Produktivität einbrach, sobald die Pellets rauer wurden und aus den Ergebnissen zur Untersuchung der zusätzlichen Glucosezugabe bei gleichzeitiger Drehzahlerhöhung in Kapitel 3.2.2 bekannt war, dass limitierende Effekte bzgl. der Bildung von Biomasse bereits bei Glucosekonzentrationen ab 10 g/L auftraten, wurde vermutet, dass ein

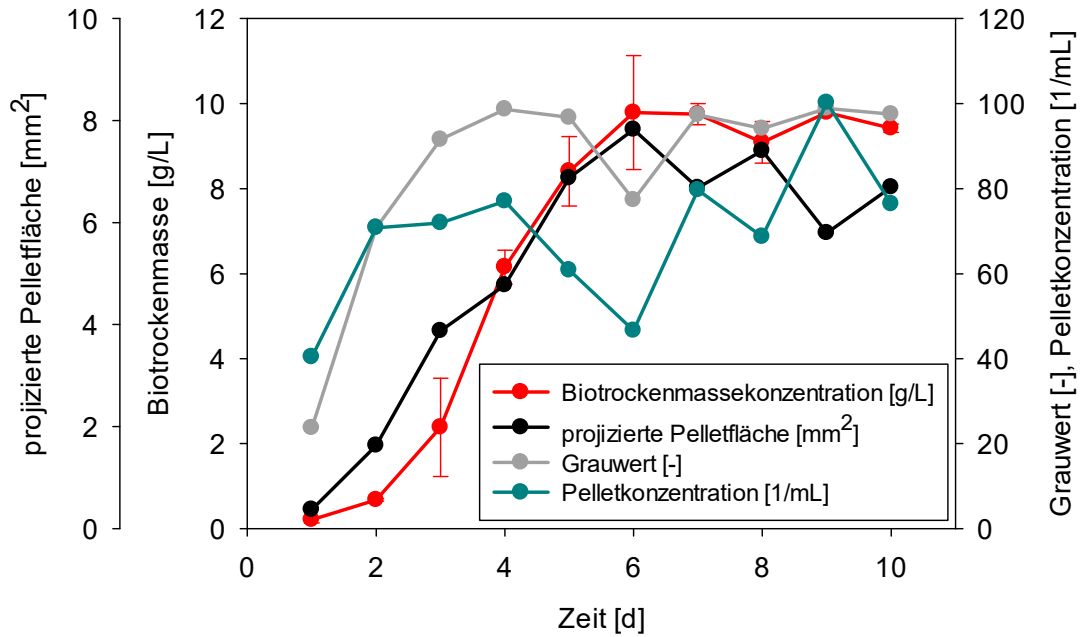


Zusammenhang zwischen dem frühzeitigen Einsetzen einer Glucoselimitierung und der Zunahme der Pelletrauheit bestand. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht bestätigt werden. Bei Erhöhung der Glucosekonzentration nach 48 h Kultivierung um 10 g/L (ohne Erhöhung der Schüttelfrequenz) war die Rauheit ( $R = 0,75$ ) im Vergleich zu Pellets aus Kultivierung ohne Glucosezugabe ( $R = 0,76$ ) nahezu unverändert.

### **3.4.3 Abschätzung der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf mit Hilfe morphologischer Parameter**

Die Änderung der projizierten Pelletfläche, der Pelletkonzentration sowie des mittleren Pelletgrauwerts (arithmetisches Mittel) im Kultivierungsverlauf wurde mit der Änderung der Biotrockenmassekonzentration verglichen. Die verschiedenen morphologischen Parameter wurden in unterschiedlichen Kombinationen mathematisch zusammengefasst, um den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration in unterschiedlichen Kultivierungsführungen von *S. commune* abbilden zu können.

Es wurden batch- und fedbatch-Kultivierungen betrachtet sowie Kultivierungen, die mit ganzen Pellets beimpft wurden oder solche, deren Kultivierung durch Zugabe homogenisierter Pilzsuspension gestartet wurde. Zudem wurde in unterschiedlichen Maßstäben (Schüttelkolben, Bioreaktor) kultiviert. Der Kultivierungsverlauf wurde jeweils bis in die stationäre Phase betrachtet. Dabei wurden empirisch verschiedene Beziehungen zwischen den morphologischen Parametern aufgestellt, um eine an das jeweilige Verfahren angepasste Berechnung der Biotrockenmassekonzentration über den gesamten Kultivierungsverlauf zu ermöglichen. Am nachfolgenden Beispiel sind zunächst die Biotrockenmassekonzentration sowie die relevanten morphologischen Parameter im Verlauf einer zehntägigen Kultivierung im batch-Verfahren im Schüttelkolben in erster Vorkultur dargestellt. An diesem Beispiel wird anschließend erläutert, weshalb verschiedene Beziehungen zwischen den morphologischen Parametern ausgewählt wurden, um die Konzentration der Biotrockenmasse in unterschiedlichen Kultivierungen ermittelt zu können.



**Abb. 3.49:** Konzentration der Biotrockenmasse und morphologische Parameter im Kultivierungsverlauf einer batch-Kultivierung in Schüttelkolben in erster Vorkultur, beimpft mit homogenisiertem Luftmycel.

Die projizierte Pelletfläche stellte bereits eine gute Annäherung der Biotrockenmassekonzentration im Kultivierungsverlauf dar. Wurde anstatt der projizierten Pelletfläche das Volumen der ellipsoidalen Pellets eingesetzt, welches über die projizierte Pelletfläche zugänglich war, so ergab sich keine verbesserte Annäherung des Verlaufs.

Gleichungen 3.7 bis 3.10 wurden empirisch gefunden und verwendet, um die Konzentration der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf zu beschreiben. Je nach Art der Kultivierungsführung wurde dazu eine der verschiedenen Gleichungen ausgewählt. Die Multiplikation nur von projizierter Pelletfläche und Pelletkonzentration (Gleichung 3.10), welche die einfachste und naheliegendste Zusammenfassung zur Beschreibung der Biotrockenmasse darstellt, war meist schlechter geeignet, um den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration abzubilden.

$$M1 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\bar{G}_i \cdot PPF_i)}{n} \cdot \overline{PPF} \cdot \frac{\text{Pellets}}{\text{mL}} \quad (\text{Gl. 3.7})$$

$$M2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\bar{G}_i)}{n} \cdot \overline{PPF} \cdot \frac{\text{Pellets}}{\text{mL}} \quad (\text{Gl. 3.8})$$

$$M3 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\bar{G}_i \cdot PPF_i)}{n} \quad (\text{Gl. 3.9})$$

$$M4 = \overline{PPF} \cdot \frac{\text{Pellets}}{\text{mL}} \quad (\text{Gl. 3.10})$$

mit

$\overline{G_i}$  = mittlerer Grauwert von Pellet i [-]

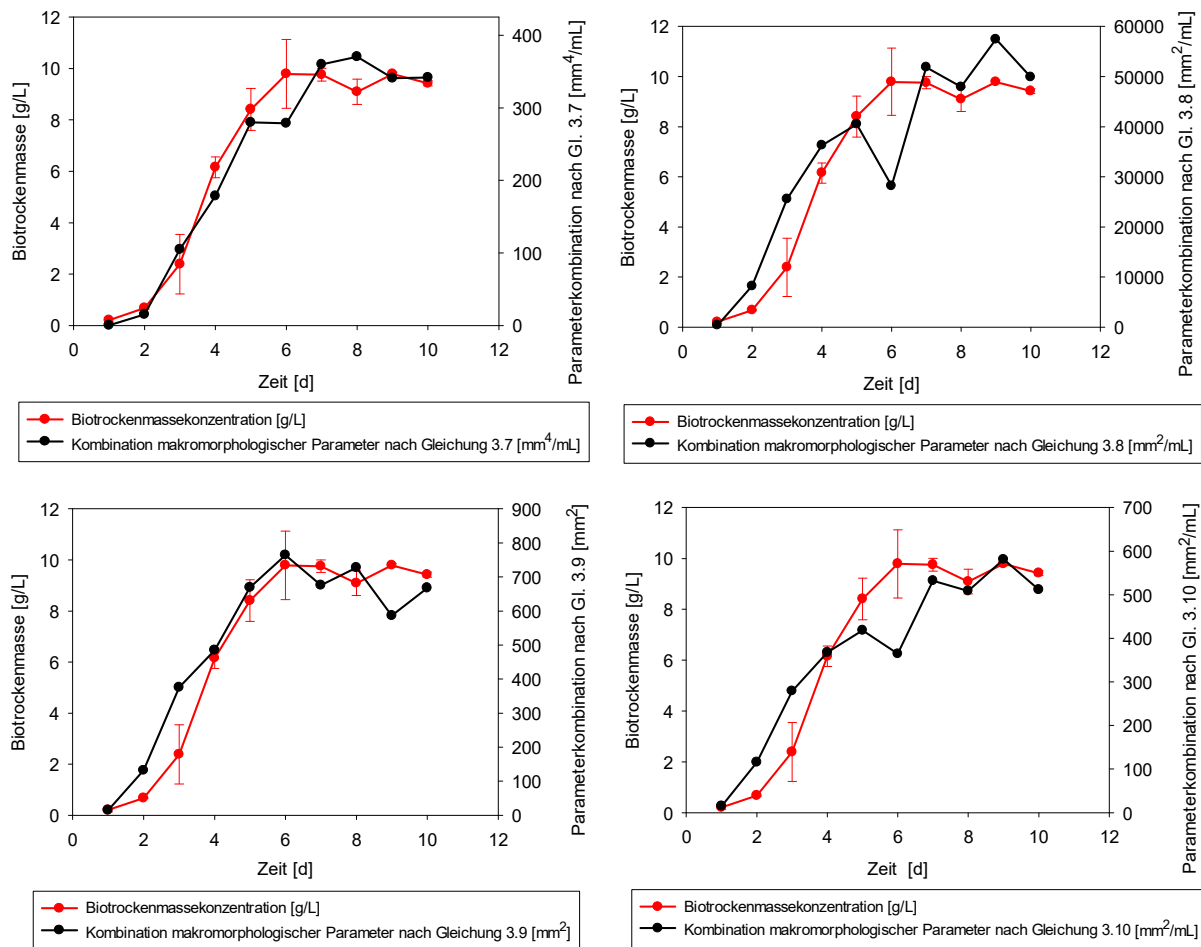
$PPF_i$  = projizierte Pelletfläche von Pellet i [mm<sup>2</sup>]

n = Anzahl mikroskopierter Pellets (150)

$\overline{PPF}$  = arithmetisches Mittel der projizierten Pelletfläche [mm<sup>2</sup>]

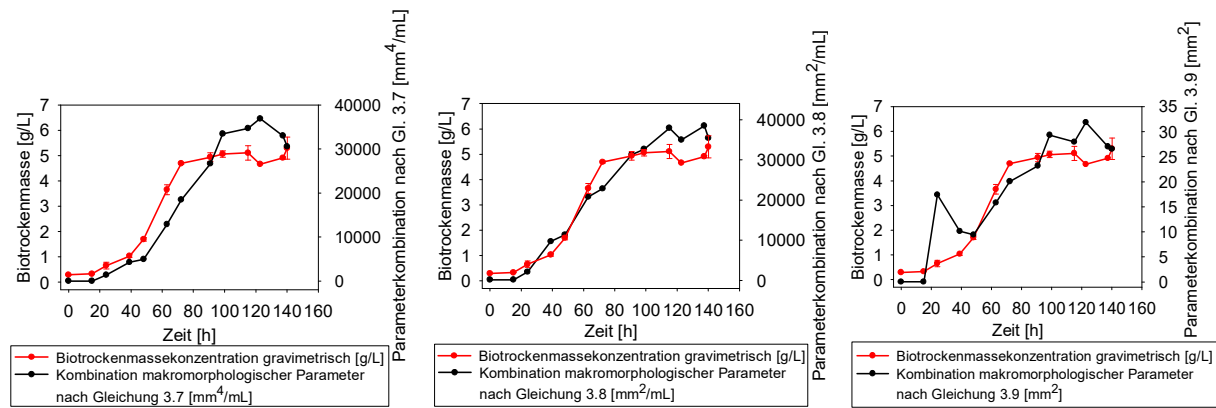
$\frac{\text{Pellets}}{\text{mL}}$  = Pelletkonzentration in Kultursuspension

Der erste Teil von Gleichung 3.7 zeigt, dass die projizierte Pelletfläche von jedem Pellet i in einer Probe mit dem zugehörigen mittleren Grauwert multipliziert wurde. Dies wurde für 150 Pellets je Probe vorgenommen und daraus der Mittelwert errechnet. Die projizierte Pelletfläche jedes Pellets wurde damit nach ihrer apparenten Dichte gewichtet. Der errechnete Mittelwert wurde zusätzlich mit dem arithmetischen Mittel der projizierten Pelletfläche multipliziert und durch Multiplikation mit der Pelletkonzentration auf das Volumen der Kultursuspension bezogen. Diese nach Gleichung 3.7 berechneten Werte korrelierten besser mit der gemessenen Biotrockenmassekonzentration als die volumenbezogene Pelletfläche (Abb. 3.50). Zudem war die Korrelation etwas besser als für die mit Gleichung 3.8 oder Gleichung 3.9 berechneten Werte, die jeweils eine reduzierte Form von Gleichung 3.7 darstellen.



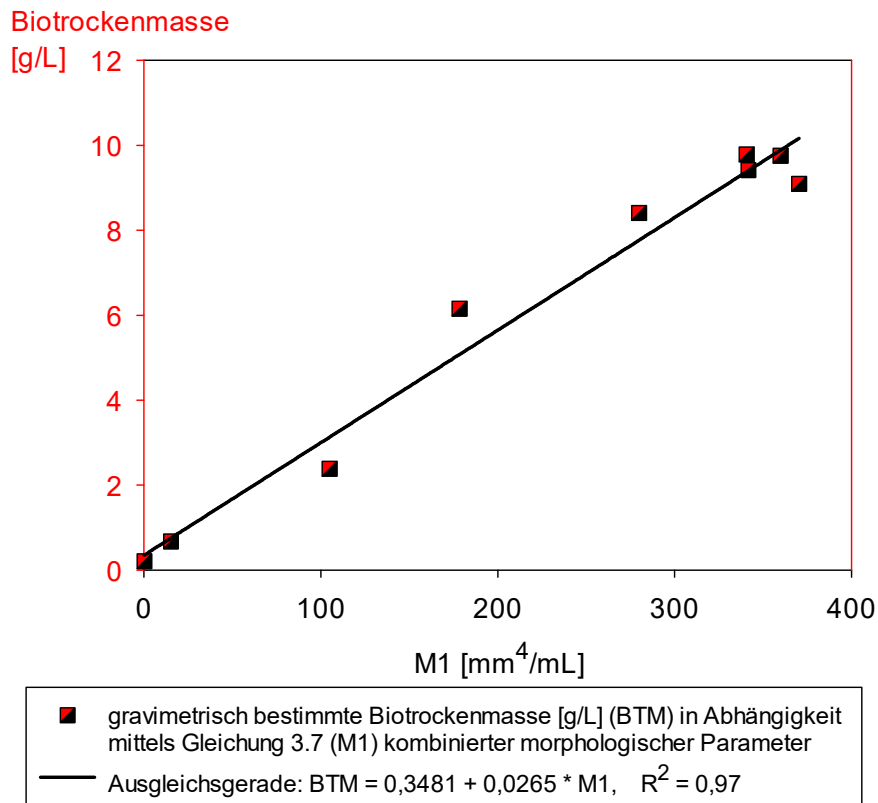
**Abb. 3.50:** Konzentration der Biotrockenmasse (gravimetrisch bestimmt) im Kultivierungsverlauf einer batch-Kultivierung in Schüttelkolben in erster Vorkultur, beimpft mit homogenisiertem Luftmycel. Darstellung jeweils gemeinsam mit durch Gleichung 3.7 bis 3.10 zusammengefassten morphologischen Parametern.

Die nachfolgende Abbildung zeigt, dass Gleichung 3.7 jedoch nicht am besten geeignet war, um die Biotrockenmassekonzentration im Verlauf einer Reaktorkultivierung, die mit homogenisierter Kultursuspension beimpft wurde, zu beschreiben. Wenn die projizierte Pelletfläche nicht mit dem Grauwert gewichtet wurde, so ergab sich eine deutliche bessere Korrelation (Gl. 3.8). Zusätzlich ist in Abbildung 3.51 gezeigt, dass die Pelletkonzentration in jedem Fall einbezogen werden musste, um eine gute Annäherung zu erhalten. Wurde diese hingegen vernachlässigt (Gleichung 3.9), so ergaben sich insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Kultivierung deutliche Abweichungen, da viele der durch die Homogenisierung erzeugten Pelletfragmente nicht anwuchsen und abgebaut wurden, sodass die Konzentration deutlich absank, während einige Pellets gleichzeitig größer und dichter wurden.



**Abb. 3.51:** Konzentration der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf einer batch-Kultivierung im Reaktormaßstab (30 L), beimpft mit homogenisierter Kultursuspension. Darstellung jeweils gemeinsam mit durch Gleichung 3.7 bis 3.9 zusammengefassten morphologischen Parametern.

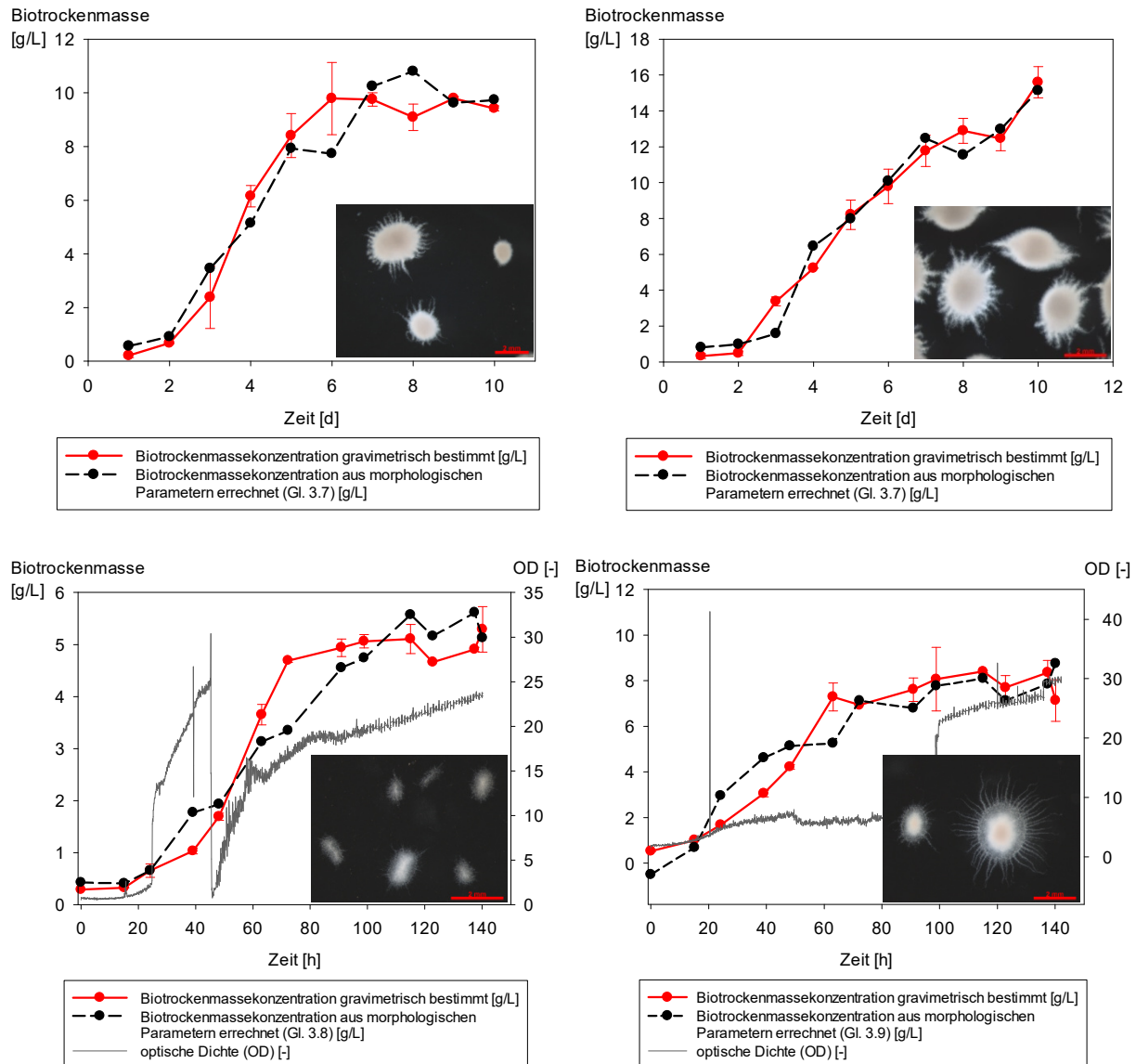
Um die zusammengefassten Morphologieparameter in der Einheit g/L angeben zu können, wurde eine lineare Regression mit den gravimetrisch gemessenen Werten erstellt. Dazu wurde der jeweilige Wert, welcher in Gramm je Liter angegeben werden sollte, in der dazu erstellten Kalibriergerade weggelassen und aus der linearen Regression der übrigen Wertepaare berechnet. Damit wurde vermieden Werte, die berechnet werden sollten, in die Kalibrierung miteinzubeziehen. Das Beispiel in Abbildung 3.52 stellt eine entsprechende lineare Regression dar, die genutzt wurde, um für die Kultivierung im batch-Verfahren, die in Abbildung 3.50 dargestellt ist, die Konzentration der Biotrockenmasse nach 6 Tagen der zehntägigen Kultivierung zu berechnen. Dazu musste der mit Gleichung 3.7 aus morphologischen Parametern errechnete Wert anschließend nur noch in die Geradengleichung der Regression eingesetzt werden.



**Abb. 3.52:** Lineare Regression für die Auftragung der gravimetrisch bestimmten Biotrockenmassekonzentration gegen die mit morphologischen Parametern angenäherte Biotrockenmassekonzentration (Gl. 3.7) einer batch-Kultivierung im Schüttelkolben in erster Vorkultur (siehe Abbildung 3.50). Es wurden alle berechneten und gemessenen Werte gegeneinander aufgetragen bis auf die Werte für die Probe nach 6 Tagen Kultivierung, um den Wert für diese Probe anschließend in g/L mit der abgebildeten Gerade zu berechnen, ohne dass dieser zuvor für die Berechnung der Korrelation verwendet wurde.

Für jede Probe zu den verschiedenen Kultivierungszeitpunkten wurde eine entsprechende Geradengleichung erstellt, sodass damit für die jeweilige Probe eine Umrechnung in Gramm Biotrockenmasse je Liter Kultursuspension erfolgen konnte. Die Auftragung der auf diese Weise ermittelten Werte ist in Abbildung 3.53 dargestellt. Der Verlauf ähnelte dem der gravimetrisch bestimmten Konzentration der Biotrockenmasse sehr und nur nach 6 und 8 Tagen traten größere Abweichungen auf. Die größte Abweichung, die sich für den sechsten Tag der Kultivierung ergab, kam aufgrund einer verminderten Pelletkonzentration in dem Schüttelkolben zustande. Die Abweichung wurde zwar zum Teil dadurch ausgeglichen, dass die gebildeten Pellets größer waren, jedoch stieg der Grauwert, der aufgrund der größeren Pelletdicke weiter zunehmen könnte, nicht mehr weiter an. Bei hoher Pelletdicke nahm der Grauwert allgemein aufgrund der in Kapitel 3.2.1.3 erläuterten Effekte nicht mehr weiter zu (vgl. Abb. 3.23). In diesem Bereich konnten mittels Morphologieanalyse nicht alle Aspekte

vollständig berücksichtigt werden. Dennoch ließ sich die Biotrockenmassekonzentration im Kultivierungsverlauf mit Hilfe der morphologischen Analyse sehr gut abbilden.

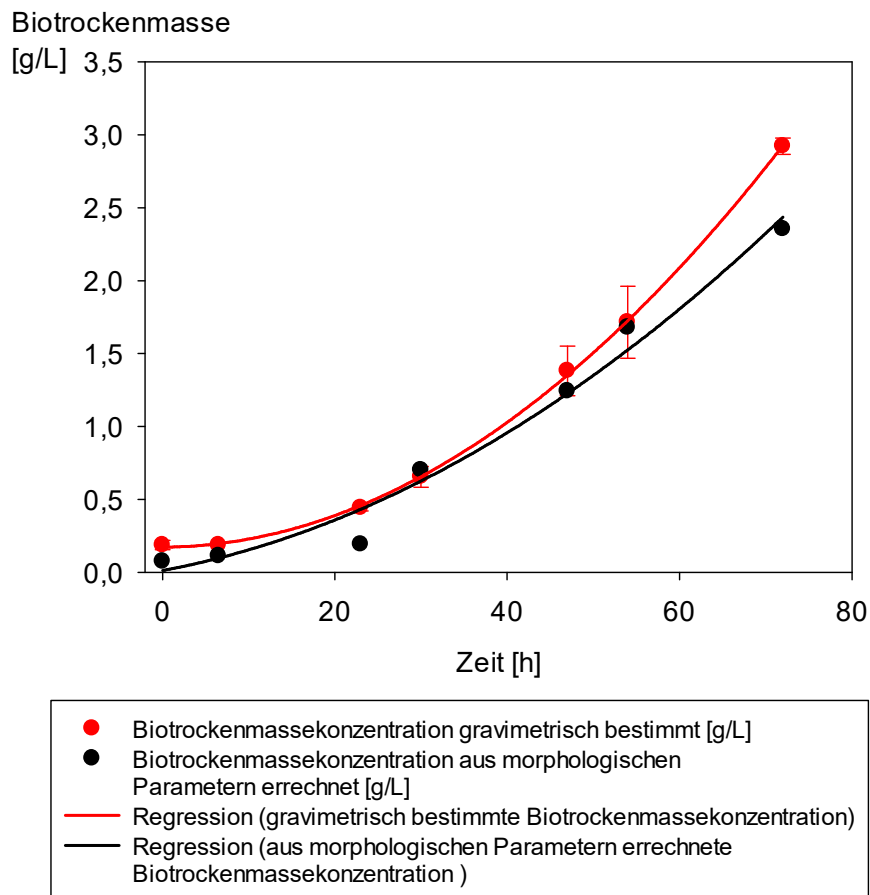


**Abb. 3.53:** Gravimetrisch bestimmte Konzentration der Biotrockenmasse und mittels morphologischen Parametern errechnete Konzentration der Biotrockenmasse in verschiedenen Kultivierungsverläufen. Zusätzlich Darstellung der optischen Dichte in Reaktorkultivierungen. Oben links: Batch-Kultivierung in erster Vorkultur (Schüttelkolben); Anwendung von Gleichung 3.7 zur Berechnung der Biotrockenmasse mittels morphologischer Parameter. Oben rechts: Fedbatch-Kultivierung in erster Vorkultur (Schüttelkolben); Anwendung von Gleichung 3.7. Unten links: Batch-Kultivierung im Bioreaktor, beimpft mit homogenisierter Kultursuspension; Anwendung von Gleichung 3.8. Unten rechts: Batch-Kultivierung im Bioreaktor, beimpft mit unzerkleinerten Pellets; Anwendung von Gleichung 3.9. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 mm.

Zusätzlich ist in Abbildung 3.53 die Biotrockenmassekonzentration im Verlauf von drei weiteren, sich von der batch-Kultivierung im Schüttelkolben unterscheidenden Kultivierungen dargestellt; jeweils im Vergleich zu der berechneten Konzentration aus den zusammengefassten makromorphologischen Parametern. Je nach Kultivierung wurde eine der Gleichungen 3.7 bis 3.10 verwendet. Die entsprechend verwendete Gleichung ist jeweils in der Abbildung angegeben. Die mittels morphologischen Parametern errechneten Konzentrationen der Biotrockenmasse zeigten im Verlauf der unterschiedlichen Kultivierungen den gravimetrisch bestimmten Konzentrationen sehr ähnliche Werte; sowohl für Kultivierungen im Schüttelkolben, die mit homogenisiertem Luftmycel beimpft wurden und anschließend im batch- oder im fedbatch-Verfahren angezogen wurden als auch für Kultivierungen im Reaktormaßstab, welche entweder mit homogenisierter Pilzsuspension inokuliert wurden oder auch direkt mit unzerkleinerten Pellets beimpft wurden. Es wurden nur wenige Abweichungen festgestellt. Die Messung der optischen Dichte bei Kultivierung im Bioreaktor zeigte eine weitaus geringere Korrelation zu der gravimetrisch ermittelten Konzentration der Biotrockenmasse, insbesondere aufgrund sprunghafter Veränderungen (Abb. 3.53).

Da insbesondere Kultivierungen im Bioreaktor, die von Inokulum mit homogenisierter Kultursuspension ausgehend gestartet werden, aufgrund ihrer hohen Produktivitäten für die Anwendung in der Praxis interessant sind, wurden auch für die Kultivierungen im 3L-Reaktor-Maßstab die morphologischen Parameter für alle Proben im Kultivierungsverlauf aufgenommen. Die morphologischen Parameter wurden entsprechend Gleichung 3.8 zusammengefasst und mit der Biotrockenmasse korreliert. Für die Kultivierung N4 (siehe voll-faktorieller Versuchsplan) wurde die gravimetrisch gemessene Biotrockenmassekonzentration linear mit den durch Einsetzen der aus Gleichung 3.8 hervorgehenden Werten korreliert. Mit Hilfe der Geradengleichung („Kalibriergerade“) wurde für die Proben einer weiteren Kultivierung (N5) die Biotrockenmassekonzentration berechnet. Die gravimetrisch bestimmte und die berechnete Konzentration der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf sind in Abbildung 3.54 gezeigt.





**Abb. 3.54:** Gravimetrisch und mittels Daten der makroskopischen Morphologieanalyse (Gl. 3.8) von *S. commune* ermittelte Konzentration der Biotrockenmasse im Verlauf einer Reaktorkultivierung im 3L-Maßstab (Versuch N5, Tab. 2.13).

Der Verlauf der gravimetrisch gemessenen Biotrockenmassekonzentration konnte für diese batch-Kultivierung im Bioreaktor sehr gut abgebildet werden. Da in diesem Beispiel zur Umrechnung in g/L ausschließlich Werte einer anderen, aber in etwa vergleichbaren Kultivierung für die Erstellung der Geradengleichung verwendet wurden, konnte Gleichung 3.8 somit für *S. commune* als allgemein anwendbar validiert werden.

Aus den Untersuchungen zur Abschätzung der Biotrockenmasse im Kultivierungsverlauf mit Hilfe morphologischer Parameter wurden Empfehlungen dafür abgeleitet, welche der Zusammenfassungen von makromorphologischen Parametern (Gl. 3.7 bis 3.9) sich jeweils am besten eignete, um den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration eines bestimmten Kultivierungsprozesses von *S. commune* möglichst gut zu approximieren. In Tabelle 3.8 sind die Empfehlungen für die Verwendung der Gleichungen zusammengefasst.

**Tab. 3.8:** Empfohlene Anwendungen der Gleichungen 3.7 bis 3.10 für verschiedene Kultivierungsprozesse von *S. commune*, um eine möglichst gute Approximation von gravimetrisch bestimmten Biotrockenmassekonzentrationen über den gesamten Kultivierungsverlauf zu erreichen.

Verwendete Gleichung	Art des Kultivierungsprozesses
Gleichung 3.7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Schüttelkolben beimpft mit homogenisiertem Luftmycel</li> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Schüttelkolben oder Bioreaktor beimpft mit ganzen Pellets bei mittlerer bis hoher Schüttelfrequenz oder Scherung</li> </ul>
Gleichung 3.8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Schüttelkolben beimpft mit homogenisierter Kultursuspension</li> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Schüttelkolben oder Bioreaktor beimpft mit ganzen Pellets bei hoher bis sehr hoher Schüttelfrequenz oder Scherung</li> </ul>
Gleichung 3.9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Schüttelkolben beimpft mit ganzen Pellets bei niedriger bis mittlerer Schüttelfrequenz</li> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Bioreaktor beimpft mit ganzen Pellets bei niedriger bis mittlerer Scherung</li> </ul>
Gleichung 3.10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Batch/Fedbatch-Kultivierung im Schüttelkolben oder Bioreaktor beimpft mit ganzen Pellets bei niedriger bis sehr niedriger Schüttelfrequenz oder Scherung</li> </ul>

Zusammen mit der automatischen Mikroskopie zur beschleunigten Aufnahme der Pellets und der automatischen Bildauswertung ist dieses Verfahren geeignet, um die gravimetrische Biotrockenmassekonzentrationsbestimmung zu ersetzen und eine Überprüfung des Wachstums von *S. commune* während der Kultivierung vorzunehmen. Gleichzeitig lagen dann die Werte aus der morphologischen Analyse vor. Dadurch wurde es ermöglicht während der Kultivierung z.B. eine Entscheidung darüber zu treffen, ob eine Kultivierung für die keine hohe Produktivität mehr zu erwarten ist, abzubrechen (vgl. z.B. batch-Kultivierung im Bioreaktor (30 L) beimpft mit ganzen Pellets in Abbildung 3.48).

## 4 Diskussion

### 4.1 Reproduzierbare Kultivierungsführung

Die Herausforderung die Kultivierungsbedingungen für filamentöse Pilze so einzustellen, dass die Kultivierung reproduzierbar ist, wurde in der Literatur bereits beschrieben (Driouch et al. 2010; Hansen et al. 2015; Higashiyama et al. 1998; Posch et al. 2013a). Ausführliche Untersuchungen insbesondere zu einer reproduzierbaren Generierung der Pilzmorphologie gibt es jedoch nicht. In dieser Arbeit wurden einige Parameter selektiert, welche die Pilzmorphologie in verschiedenen Kultivierungsstufen signifikant beeinflussen. Mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung konnten die Zusammenhänge abgebildet und die Einstellungen für ein möglichst robustes Verfahren für weitere Untersuchungen ausgewählt werden.

Die bei der Homogenisierung von Luftmycel eingestellte Drehzahl hatte keinen Einfluss auf die anschließend ausgebildete Morphologie. Wurde hingegen Kultursuspension homogenisiert, erwies sich die Drehzahl bei der Homogenisierung als ein maßgeblich Morphologie-beeinflussender Faktor. Da die Kultivierungsparameter bis auf die Größe des Schüttelkolbens identisch waren, kann dies darauf zurückgeführt werden, dass Luftmycel und Pellets sehr unterschiedlich auf die bei der Homogenisierung auftretenden Kräfte reagieren. Luftmycel könnte in der Zellwand z.B. mehr der stabilen Komplexe aus Chitin und  $\beta$ -Glucan enthalten, die selbst durch einen Hochdruckhomogenisator nicht zerstört werden können (Wessels et al. 1983). Zudem ist Luftmycel in seiner Struktur bereits sehr fein, sodass es – einmal auseinandergerissen – kaum noch zerkleinert werden kann, da kleine Partikel generell deutlich stabiler sind, als große Partikel. Die Hydrophobine, die von *S. commune* gebildet werden, könnten ebenfalls zu diesem Effekt beitragen. Sie bilden an der Luft auf der Oberfläche der Hyphen eine stabile Schicht aus, die für zusätzliche Stabilität der Hyphen sorgt (Wessels 1997). Auch die vermehrte Bildung von Vakuolen der Pellets in Kultursuspension könnte bewirken, dass diese dadurch instabiler sind und der mechanischen und hydrodynamischen Beanspruchung bei der Homogenisierung deutlich schlechter standhalten (Gibbs et al. 2000; Papagianni and Moo-Young 2002; Park et al. 2002b; G. C. Paul et al. 1994). Die Homogenisierungsdauer hatte bei Homogenisierung von Luftmycel oder Pelletsuspension jeweils eine geringe Auswirkung auf die Morphologie des Pilzes und war damit für die Reproduzierbarkeit weniger entscheidend.

Eine geringe Homogenisierungsdauer von weniger als etwa 100 s sollte jedoch trotzdem nicht gewählt werden, da der Einfluss der Homogenisierungsdauer dann deutlich zunahm. Bei längerer Homogenisierungsdauer hingegen veränderte sich die Morphologie mit Variation der Dauer der Homogenisierung kaum, sodass der Prozess in diesem Bereich relativ robust und damit besser reproduzierbar war. Interaktionseffekte von Drehzahl und Homogenisierungsdauer waren gering (vgl. Gleichung 3.3).

Neben den Homogenisierungsbedingungen wurde auch die Inokulumkonzentration als ein Faktor, der die Reproduzierbarkeit stark beeinflusst, identifiziert. Der Einfluss der Inokulumkonzentration auf die Morphologie wird im nächsten Unterkapitel ausführlich diskutiert.

Anhand der quantitativen morphologischen Untersuchung und der Verwendung der statistischen Versuchsplanung zur Beschreibung der Zusammenhänge konnte für jeden Schritt der Vorkultivierung ein maximal robuster Betriebspunkt bestimmt werden. An diesem Punkt bzw. bei den jeweiligen Parametereinstellungen war erkennbar mit welcher Wahrscheinlichkeit eine bestimmte Morphologie auftritt bzw. wie groß die mögliche Varianz an dem gewählten Betriebspunkt ist.

Die robuste Vorkultivierungsführung ermöglichte die Berechnung valider Modelle zur Beschreibung der Morphologie und weiterer Kultivierungsparameter in der Hauptkultur. Um die Anzahl an Versuchen im Reaktormaßstab gering zu halten, wurde anstatt eines CCC-Designs ein voll-faktorielles Design verwendet. Da die Auswertung eines voll-faktoriellen Versuchsplans jedoch keine quadratischen Abhängigkeiten darstellen kann, ist die reduzierte Aussagekraft des gebildeten Modells bei dessen Interpretation zu berücksichtigen.

Auch van Suijdam et al (1980) zeigten wie wichtig die Führung der Vorkultivierung ist, um eine reproduzierbare Kultivierungsführung zu erreichen. Sie kombinierten dazu auch die Inokulumkonzentration in Kombination mit bestimmten Medienzusätzen. Auch diese Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht und nachfolgend ausführlich diskutiert.

## 4.2 Beeinflussung der Morphologie

### Einfluss der Inokulumkonzentration

Mit zunehmender Inokulumkonzentration nahm die projizierte Pelletfläche exponentiell ab und die Pelletkonzentration im Gegenzug exponentiell zu. Auch bei sehr hohen Inokulumkonzentrationen wuchs *S. commune* immer noch in der Form von Pellets (Abb. 3.16.b). Ein ähnlicher Einfluss wurde bei dem Polysaccharid-bildenden Pilz *Ganoderma lucidum* beobachtet. Der Pelletdurchmesser nahm mit zunehmender Inokulumkonzentration deutlich ab. Bei einer Konzentration des Inokulums von 0,67 g/L (Biotrockenmassekonzentration) hatten etwa 70 % der Pellets einen Durchmesser von weniger als 1,2 mm. Auch bei diesem Stamm lag bei der hohen Inokulumkonzentration noch pelletförmiges Wachstum vor (Fang et al. 2002). Auch aus Untersuchungen mit sporenbildenden Pilzstämmen wird berichtet, dass die Pelletgröße abnimmt, wenn die Inokulumkonzentration ansteigt (Bizukojc and Ledakowicz 2010; Žnidaršič et al. 2000).

Andere Pilzstämmen zeigten bei hohen Inokulumkonzentrationen mycelförmiges Wachstum. Dabei sind in der Literatur fast ausschließlich Ergebnisse mit sporenbildenden Pilzstämmen genannt. Beispielsweise der sporenbildende Stamm *A. niger* PM1 bildete bei Inokulation mit  $10^4$  Sporen/mL fast ausschließlich Pellets wohingegen mit  $10^9$  Sporen/mL rein mycelförmiges Wachstum auftrat (Papagianni and Matthey 2006). Für *Trichoderma reesei* Rut C-30 wurde eine sehr ähnliche Abhängigkeit der morphologischen Ausprägung von der Inokulumkonzentration (Sporen/mL) beobachtet (Domingues et al. 2000). Dieser Zusammenhang wurde bereits 1949 festgestellt (Foster 1949). Es wurde jedoch auch bereits von *A. niger* Stämmen berichtet, die auch bei hohen Konzentrationen des Inokulums (in Form von Sporen), Pellets bildeten (Trinci 1970). Der Effekt ist somit stark stammabhängig.

Pellet-bildende Mikroorganismen können grob in drei Gruppen unterteilt werden. Den Sporen-Aggregationstyp, bei dem sich zunächst einige Sporen zu einem Agglomerat zusammenlagern, das nach Auskeimen ein Pellet bildet, den nicht aggregierenden Typ, bei dem aus einer Spore ein Pellet heranwächst und den Hyphenelement-Agglomerationstyp, bei dem mehrere Hyphen agglomerieren und aus dem Agglomerat ein Pellet entsteht (Nielsen et al. 1995; Nielsen 1996). Letzterem gehört beispielsweise *Penicillium chrysogenum* an (Packer and Thomas 1990). Der Sporen-Aggregationstyp und der nicht-aggregierende Typ wurden bereits 1977 von Metz und Kossen

beschrieben. *S. commune* könnte nur dem dritten dieser drei unterschiedlichen Typen zugeordnet werden, da keine Sporen, sondern vegetatives Luftmycel bei Beimpfen eingesetzt wird. Jedoch können aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine entsprechenden Schlussfolgerungen gezogen werden, welche die Zugehörigkeit zum dritten Typ belegen. Dies war auch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit.

Aus den Untersuchungen der Morphologie von *S. commune* in Reaktorkultivierungen, die mit homogenisierter Suspension beimpft wurden, geht hervor, dass je nach Homogenisierungseinstellungen anfänglich etwa zehn- bis achtzigtausend Pellet- bzw. Hyphenfragmente je Milliliter Kultursuspension vorhanden waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Pelletkonzentration am Ende der Kultivierung war jedoch um ein Vielfaches geringer (Abb. 3.38). Welche der anfänglich vorliegenden Fragmente aufgrund der Homogenisierung so stark geschädigt wurden, dass sie nicht mehr lebensfähig waren und abgestorben sind und/oder ob sich aus den gebildeten Fragmenten Agglomerate bildeten, die sich zu Pellets fortentwickelt haben, lässt sich auch anhand der mikroskopischen Aufnahmen nicht aussagen (Abb. A.24). Aus der Literatur sind für *S. commune* dazu keine eingehenden Untersuchungen bekannt.

Hauptsächlich die Oberflächeneigenschaften der Hyphen bei den vorliegenden Kultivierungsbedingungen könnten Aufschluss darüber geben warum *S. commune* auch bei hohen Inokulumkonzentrationen kein mycelförmiges Wachstum zeigte. Die Pelletbildung wird im Allgemeinen auf elektrostatische Wechselwirkungen, Hydrophobizität der Hyphenoberfläche und spezifische Wechselwirkungen zwischen Zellwandkomponenten zurückgeführt (J. Zhang and Zhang 2015). Ob pellet- oder mycelförmiges Wachstum auftritt, ist stark stammabhängig. Insbesondere die physikalischen Oberflächeneigenschaften der Hyphen, wie zum Beispiel deren zeta-Potenzial, spielen hierbei vermutlich eine große Rolle (Wargenau et al. 2011). Die Hyphenoberfläche von *S. commune* ist mit einer Polysaccharidschicht aus Schizophyllan überzogen (Kisser et al. 1980; Y. Zhang et al. 2013). Das Polysaccharid sorgt für eine hydrophile Hyphenoberfläche. Zudem besteht die Zellwand selbst aus R- und S-Glucan sowie Chitin und ist daher hydrophil (Sietsma and Wessels 1979). Aufgrund der ungeladenen Oberfläche der Hyphen ist es unwahrscheinlich, dass Anziehungskräfte stärker als die schwachen Van-der-Waals-Kräfte vorliegen, die dafür sorgen, dass sich die Hyphen zu Agglomeraten aneinander lagern. Zwar bildet *S. commune* Hydrophobine, die ins Medium sekretiert werden, jedoch müssen für diese

amphiphilen Proteine entsprechende Grenzflächen (z.B. hydrophobe Oberfläche in wässrigem Medium) vorhanden sein, um sich anzulagern und mittels self-assembly eine amyloid-ähnliche Struktur auszubilden, die dann eine Bindung bzw. Agglomeration der Hyphen ermöglichen würde (Scholtmeijer et al. 2009; Wösten and Scholtmeijer 2015). Von einer vermehrten Sporenaggregation bei erhöhter Hydrophobizität wurde jedoch bereits berichtet (Ryoo and Choi 1999). Für den Sporenbildenden Pilz *A. nidulans* wurde gezeigt, dass bei Deletion einzelner Hydrophobingene die Hydrophobizität der Sporenoberfläche geringer war und daher kleinere und weniger dicht gewachsene Pellets gebildet wurden (Dynesen and Nielsen 2003). Für *S. commune* ist nicht bekannt, dass sich die gebildeten Hydrophobine in wässrigem Medium auf der Hyphenoberfläche anlagern und dann, mit ebenfalls mit Hydrophobinen belegten Hyphen, aggregieren (Sunde et al. 2008). Im Luftmycel ist die Hyphenoberfläche zwar von der amyloid-ähnlichen Hydrophobinschicht überzogen, jedoch war nach Homogenisierung deutlich zu erkennen, dass die Hyphen an Agarstücke assoziiert sind, die sich nur langsam auflösten, sodass eine Agglomeration aufgrund hydrophober Wechselwirkungen unwahrscheinlich scheint. Zudem gehen mit dem Wachstum der Hyphen die hydrophoben Oberflächeneigenschaften verloren und es entstehen wieder von Polysaccharid überzogene Hyphenstränge (Fariña et al. 2009). Ebenfalls unwahrscheinlich ist es, dass Hydrophobine zu einer Agglomeration beitragen, wenn mit homogenisierter Kultursuspension beimpft wird, da beim Homogenisieren von Kultursuspension ein sehr stabiler Schaum entsteht, der vermutlich ebenfalls durch Hydrophobine stabilisiert wird, die sich an der Phasengrenzfläche zwischen Medium und Luft ausrichten und die amyloid-ähnliche Struktur bilden (Kershaw and Talbot 1998; Wösten and Scholtmeijer 2015). Dadurch sind die Hydrophobine aus dem Medium nicht mehr verfügbar und eine Agglomeration durch hydrophobe Wechselwirkung ist auch aus diesem Grund unwahrscheinlich. Bei allen Kultivierungen war zudem das Wachstum von Luftmycel am Glas des Schüttelkolbens oder an der Reaktorwand zu beobachten. Hierbei könnten die Hydrophobine ebenfalls eine Rolle spielen. Sie lagern sich mit der hydrophoben Seite an und an der hydrophilen Seite können sich die hydrophilen Oberflächen der Hyphen aus der Suspension anlagern. Auch dadurch könnte ihre Konzentration im Medium verringert werden. Filamentöses Wachstum kann auch durch eine gegenseitige Abstoßung von Zellwänden aufgrund gleicher Oberflächenladungen begünstigt werden (Žnidaršič et al. 2000). Dies tritt z.B. auch bei

Sporen, die Melanin (mit Carboxylgruppen) enthalten, auf (J. Zhang and Zhang 2015). Da die Hyphenoberfläche von *S. commune* jedoch keine Oberflächenladungen aufweist, ist ein dadurch induziertes filamentöses Wachstum auszuschließen (Wessels et al. 1983). Auf Grundlage der vorliegenden Literatur ist allgemein nicht davon auszugehen, dass Pellets von *S. commune* durch Agglomeration der Hyphen entstehen. Auch sind keine Kräfte aufgrund von Oberflächenladungen oder spezifischen Komponenten der Zellwand bekannt, die zu einem mycelförmigen Wachstum führen. Diese Art des Wachstums allein durch hohe Inokulumkonzentrationen zu erzielen, erscheint daher unwahrscheinlich, was durch die Ergebnisse gestützt wird. *S. commune* kann keinem der in der Literatur erwähnten Typen der Mycelentwicklung zugeordnet werden (Nielsen 1996). Aufgrund der Ergebnisse und der aus der Literatur bekannten Oberflächeneigenschaften ist anzunehmen, dass *S. commune* vorrangig als Pellet wächst. Die einzelnen Pellets entstehen nicht aus Hyphenagglomeraten, sondern wachsen aus einzeln vorliegenden Hyphen oder Pelletbruchstücken (nach Homogenisierung) heran. Das Verhalten ist somit vergleichbar mit dem nicht aggregierenden Typ der sporenbildenden Stämme.

Papagianni und Moo-Young (2002) untersuchten das morphologische Verhalten eines Stammes von *A. niger* ATCC 13496 bei direktem Beimpfen mit Sporen verschiedener Konzentration und im Vergleich dazu mit vegetativem Mycel aus seiner Vorkultur. Bei der höheren der getesteten Sporenkonzentrationen wuchs der Pilz filamentös bzw. bei niedriger Sporenkonzentration in feinen Pellets und filamentöser Form. Bei Beimpfen mit vegetativem Mycel hingegen wurden große Pellets ausgebildet. Die Zusammenhänge, die zu den unterschiedlichen morphologischen Ausprägungen führen, wurden von den Autoren nicht beschrieben. Bei Verwendung von vegetativem Mycel werden wie bei *S. commune* auch hier Pellets ausgebildet.

Domingues et al. (2000) zeigten zudem, dass durch Zusatz von Tween 80 zum Medium die Bildung von Pellets unterdrückt wurde. Es wurde postuliert, dass die oberflächenaktiven Eigenschaften von Tween 80 zu diesem Verhalten beitragen. Bei Untersuchungen mit dem Bakterium *Streptomyces tendae* wurde erkannt, dass das Bakterium vermehrt Pellets ausbildete, wenn die Hydrophobizität der Zellwand anstieg (Vecht-Lifshitz et al. 1990). Ein ähnlicher Effekt wurde bei *Trichoderma harzianum* IMI 206040 entdeckt, wenn Tween 40 zugesetzt wurde. Bei niedriger Konzentration an Tween 40 wurden fast ausschließlich Pellets gebildet, wohingegen bei hoher



Konzentration kleinere Pellets entstanden und zusätzlich vermehrt mycelförmiges Wachstum auftrat. Es wurde vermutet, dass dieser Effekt durch Einlagerung des Tweens in die Zellwand ausgelöst wurde, wodurch die Sporen nicht mehr aggregieren können (Lucatero et al. 2004). Die Konzentration der Biotrockenmasse nahm proportional (linear) zum mittleren Durchmesser ab. Auch bei den Untersuchungen in dieser Arbeit zeigte sich, dass die Konzentration der Biotrockenmasse von *S. commune* abnahm, wenn größere Pellets gebildet wurden (Abb. 3.14.B). Dieser Effekt wurde in sehr ähnlicher Weise auch bei *Trichoderma harzianum* IMI 206040 gefunden (Lucatero et al. 2004). Die Ursache dafür kann in den limitierenden Eigenschaften großer Pellets liegen, die keine ausreichende Substratversorgung im Pelletinneren mehr zulassen. Hierzu wurden bereits zahlreiche Untersuchungen veröffentlicht (Bizukojc and Ledakowicz 2010; Cui et al. 1998; Domingues et al. 2000; Driouch et al. 2010; Driouch et al. 2011; Espinosa-Ortiz et al. 2016; Fang et al. 2002; Hille et al. 2005; Lin et al. 2010; Papagianni et al. 1999; Posch et al. 2012; Schügerl et al. 1998; Sinha et al. 2001a). Bei Kultivierung von *S. commune* in zweiter Vorkultur stellte sich der Zusammenhang zwischen der Pelletgröße und der gebildeten Biotrockenmasse hingegen etwas anders dar. Die Konzentration der Biotrockenmasse nahm mit zunehmender Pelletgröße zu, jedoch bei Bildung größerer Pellets wieder ab (Abb. 3.19.B). Grund hierfür könnte das unterschiedliche Verhalten des Pelletwachstums aufgrund der vorangegangenen Homogenisierung von Luftmycel bzw. Kultursuspension sein. Die Pellets, die aus homogenisierter Kultursuspension heranwachsen, könnten durch eine lockere Mycelstruktur auf der Außenseite und/oder im Pelletinneren weniger substratlimitierende Eigenschaften aufweisen.

### **Einfluss von Mikropartikeln**

Einige Mikropartikel beeinflussten die Morphologie von *S. commune* erheblich. So vor allem die Mikropartikel aus Talk, wenn diese in einer Konzentration von 14 g/L zugesetzt wurden. Die projizierte Pelletfläche nahm deutlich zu und die Pellets wurden rauer. Der Einfluss von Talkmikropartikeln auf die Morphologie filamentöser Pilze wurde bereits in ähnlicher Konzentration getestet. So zeigten Coban und Mitautoren (2015a), dass sich der durchschnittliche Pelletradius von Pellets des Stamms *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 um das 5-fache auf nur 100 µm reduzierte, wenn der Kultursuspension Talkmikropartikel (15 g/L) zugesetzt wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen der Pellets zeigten ähnlich wie bei *S. commune* überproportional lange

Hyphenfortsätze im Außenbereich der Pellets, die auf die Anwesenheit der Talkpartikel zurückgeführt werden könnten. Es wurde nicht postuliert wie Talk zur Veränderung der Morphologie geführt haben könnte (Coban et al. 2015a, 2015b). Etschmann et al. (2014) testeten unter anderem Talkpartikel verschiedener Größe in Kultivierung mit *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (kein Sporenbildner, vegetatives Mycel zum Beimpfen verwendet). Talkpartikel mit einem Median ( $x_{50,3}$ ) von 4,5  $\mu\text{m}$  führten zu einer deutlich erhöhten Produktkonzentration im Kultivierungsverlauf während die größeren Talkpartikel ( $x_{50,3} = 7,0 \mu\text{m}$ ) keinen Einfluss auf die Produktkonzentration hatten. Auch morphologische Veränderungen durch die Talkpartikel wurden beobachtet, jedoch nicht quantifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnte für *S. commune* ebenfalls eine Korrelation zwischen der Partikelgröße der Talkpartikel und der Raum-Zeit-Ausbeute sowie der Morphologie festgestellt werden. Talkpartikel wurden von Etschmann et al. (2014) auch in Kultivierungen von *Aspergillus niger* DSM 821 eingesetzt. Der Talkpartikelzusatz hatte für diesen Organismus den gleichen positiven Effekt auf die Produktkonzentration und auch die spezifische Produktbildung unabhängig von der Partikelgröße. Der Effekt ist stammabhängig. Dies konnte in dieser Arbeit auch durch Vergleich der morphologischen Parameter von *S. commune* und *S. rolfsii* bei Kultivierung mit den gleichen Mikropartikeln eindeutig gezeigt werden. Die erhöhte spezifische Produktbildung könnte durch eine stärker aufgelockerte Struktur der Pellets durch die Anhaftung an die Mikropartikel bzw. ein verändertes Zusammenspiel von Anziehungs- und Abstoßungskräften der Hyphen aufgrund der Anlagerung an die Partikel verursacht worden sein. Wie in dieser Arbeit beeinflussten auch die unter allen von Etschmann et al. (2014) untersuchten Partikeln die Talkpartikel, die Produktbildung am stärksten. Die Partikeldurchmesser wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, mittels Laserbeugung bestimmt und es kann somit von vergleichbaren tatsächlichen Partikelgrößen ausgegangen werden. Bei genauerer Betrachtung der Pelletstruktur im Pelletrandbereich fiel auf, dass die Pellets aus Kultivierung mit Talk im Randbereich lange parallele Hyphenfortsätze mit lockerer Struktur und weniger verzweigten Hyphenstrukturen aufwiesen (Abb. A.7) als Pellets, die ohne Talkzusatz herangewachsen waren. Die aus den Pellets ragenden Hyphenbündel wirkten höher verzweigt und dadurch dichter gewachsen mit weniger lockerer Struktur als bei Pellets aus Kultivierung mit Talkpartikeln (Abb. A.22 und A.25). Gründe, die zu dieser Strukturänderung führen könnten, werden im Abschnitt weiter unten diskutiert. An dieser Stelle sei zudem darauf hingewiesen, dass es sich bei den

gemachten Beobachtungen nur um augenscheinliche Unterschiede handelt, die hauptsächlich mikro-morphologischer Natur sind. In dieser Arbeit wurden jedoch nur makromorphologische Veränderungen quantifiziert. Zur Untersuchung der Mikromorphologie werden andere Objektive mit höherer Vergrößerung, weniger Tiefenschärfe, aber dafür verbesserter Auflösung benötigt. Hier sei kurz auf Publikationen hingewiesen, in denen mikromorphologische Eigenschaften wie z.B. die Verzweigung von Hyphen untersucht werden (Nielsen 1996; Spohr et al. 1998; Trinci 1974).

Tao et al. (2018) stellten bei *Grifola frondosa* ebenfalls einen Einfluss von Talkpartikeln auf die Morphologie und die damit assoziierte Polysaccharidbildung fest. Mit zunehmender Talkkonzentration wurden im Gegensatz zu den Beobachtungen bei *S. commune* kleinere Pellets gebildet. Die Exo-Polysaccharidkonzentration war bei geringer bis mittlerer Talkkonzentration am höchsten. Zudem veränderten sich mit der Talkkonzentration die Anteile der Monosaccharide des Polymers. Dies wurde auf veränderte Enzymaktivitäten der entsprechenden Polymersynthesen zurückgeführt.

Auch Mikropartikel aus Titan-Silikat-Oxid beeinflussten die Morphologie von *S. commune*. Jedoch deutlich geringer als dies in der Literatur z.B. für *A. niger* Stämme beschrieben ist. Driouch et al. (2011) verringerte sich der durchschnittliche Pelletdurchmesser fast um das 10-fache (ab 20 g/L  $\text{TiSiO}_4$ ). Es bildeten sich Mikropartikelaggregate etwas durchsetzt von Mycel, das aber hauptsächlich auf der Außenseite der Aggregate wuchs. Durch welche Wechselwirkung zwischen Partikeln und Pilzzellen die beobachteten Effekte hervorgerufen wurden, wurde nicht diskutiert. Die Autoren verweisen darauf, dass die Kräfte zwischen Partikeln, Sporen und Hyphen z.B. mittels Atomkraft-Mikroskopie bestimmt werden müssen.

Weitere interessante Rückschlüsse auf die Mechanismen der Partikel-Pilz-Wechselwirkung, können bei Vergleich mit den Ergebnissen, die von Kaup et al. (2008) erzielt wurden, gezogen werden. Die Autoren beschreiben den Einfluss von Aluminium Oxid und Talk auf die Morphologie von *Caldariomyces fumago*. Die Ergebnisse von Kaup et al. (2008) sind hier herausgegriffen, da in den Untersuchungen ebenfalls mit homogenisiertem Pilzmycel beimpft wurde und die eingesetzten Partikelkonzentrationen denen entsprechen, die zur Untersuchung von *S. commune* verwendet wurden. Wurden der Kultursuspension mit Beginn der Kultivierung die Mikropartikel zugesetzt (10-15 g/L) zeigte *C. fumago* mycelförmiges Wachstum anstatt

pelletförmigen Wachstums, das ohne Zusatz der Partikel vorlag. Das eingesetzte Talk und Aluminium Oxid hatte hier einen sehr ähnlichen Effekt auf die Morphologie wohingegen bei *S. commune* bei Verwendung von Aluminium Oxid überhaupt keine Veränderungen auftrat. Kaup et al. (2007) folgerten, dass die Mikropartikel einer Aggregation der Hyphen entgegen wirkten, dem ersten Schritt der Pelletbildung in der Fermentation filamentöser Mikroorganismen (Nielsen 1996; O’Cleirigh et al. 2005). Diese Art der Pelletbildung wurde für den sporenbildenden Pilz *Penicillium chrysogenum* beschrieben, dessen Hyphen sich nach Erreichen einer bestimmten Größe zu Agglomeraten zusammenlagern, die weiter zu Pellets heranwachsen (Nielsen et al. 1995). Kaup und Coautoren postulierten, dass die Partikel die Wechselwirkungen zwischen den Hyphen hemmen könnten und/oder, dass die Partikel für zusätzliche Scherung sorgen, wodurch die Ausbildung von Agglomeraten unterdrückt werden könnte. Darüber hinaus veröffentlichten sie eine Liste mit filamentösen Pilzen und auch einem filamentös wachsenden Bakterium, darunter auch ein Basidiomycet, wonach im Vergleich zur partikelfreien Referenzkultivierung bei Zusatz von Talk- oder Aluminiumoxidpartikeln prinzipiell kleinere Pellets oder teilweise vereinzelte Hyphen gebildet wurden. Die Tatsache, dass die Morphologie von *S. commune* sich bei Zusatz dieser Mikropartikel vollkommen divergent verhält, lässt auf andere Mechanismen der Pelletbildung unter Partikelzugabe schließen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die hydrophoben Oberflächeneigenschaften von Talkpartikeln mit ihrer Größe verändern. Die Oberfläche kleinerer Talkpartikel ist demnach hydrophober als die größerer Talkpartikel (Leterme et al. 2005). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Talkpartikel mit verschiedener Partikelgröße untersucht. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der gebildeten Morphologie in Abhängigkeit der verwendeten Talkpartikelgröße.

Je kleiner und somit hydrophober die verwendeten Talkpartikel waren, umso größer war die gemessene projizierte Pelletfläche und umso geringer auch die Pelletkonzentration. Dies lässt vermuten, dass eine durch die Talkpartikel vermittelte Anlagerung der Hydrophobine an die Hyphen ein möglicher Mechanismus wäre, der zu den Veränderungen der Pelletmorphologie von *S. commune* führt. Talkpartikel haben die Eigenschaft, dass die basalen Oberflächen hydrophob sind, wohingegen die Kanten hydrophile Eigenschaften haben, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser und anderen polaren Substanzen ausbilden können. Auf diese Weise könnten

die hydrophilen Hyphen sich an die Partikel anlagern. Zunächst lagert sich dabei der Talkpartikel mit seinem vergleichbar hydrophilen Partikelteil an die Hyphenoberfläche an, auf diesem dann das Hydrophobin mit seinem hydrophoben Teil an den hydrophoben Mikropartikelteil. An dem nach außen zeigenden hydrophilen Anteil des Hydrophobins kann sich dann z.B. wieder eine Hyphe anlagern oder auch ein weiterer Talkpartikel, der sich wiederum an eine Hyphenoberfläche setzt. Auf diese Weise könnte eine aufgelockerte Wachstumsstruktur und die entsprechend größeren Pellets entstehen (Tab. 3.4, Abb. 3.31). Dieser Mechanismus würde auch die abnehmende Pelletkonzentration mit abnehmender Partikelgröße erklären, wenn davon ausgegangen wird, dass die hydrophoberen Partikel sich besser an die Hydrophobine anlagern können und darüber mehr Hyphen miteinander aggregieren. Es stehen somit weniger freie Hyphen zu Verfügung, die zu einzelnen Pellets heranwachsen könnten.

Kritisch ist die Kultivierung mit Talk in größeren Bioreaktoren, mittels von unten angetriebener Rührwelle. Die Mikropartikel können an der doppelten Gleitringdichtung einen vorzeitigen Verschleiß und Undichtigkeiten verursachen, mit den entsprechenden kritischen Auswirkungen für den Prozess. Es wäre eine andere Art der Durchmischung zu wählen. Die Auswirkung auf die Produktbildung, die z.B. bei Kombination von Durchmischung mittels Begasung und der Kultivierung mit Talk bestünde, wäre zu bestimmen. Dies wäre vor dem Hintergrund, dass industrielle Prozesse zwecks schnellen Produktwechsels vermehrt in Container-Bags gefahren werden und somit mittels Begasung durchmischt werden, jedoch ein interessanter Gegenstand zukünftiger Untersuchungen (Schirmer et al. 2019).

Walisko et al. (2012) geben in einer Zusammenfassung an, dass zahlreiche filamentöse Pilze durch den Zusatz von Mikropartikeln (insbesondere Talk und Aluminiumoxid) in ihrer Morphologie beeinflusst werden können. Jedoch wurde von Ihnen beschrieben, dass keine Untersuchungen und Postulierungen der zugrunde liegenden Mechanismen zwischen Partikeln und Zellen bekannt sind.

Anteck et al. (2016) geben einen aktuellen Überblick darüber, wie Mikropartikel die Morphologie beeinflussen und damit zu einer erhöhten Produktivität beitragen. Darin geben sie auch an, dass Basidiomyceten bisher kaum untersucht wurden, jedoch in den wenigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Mikropartikel auch die Morphologie der Basidiomyceten deutlich beeinflussen können.

## **Einfluss weiterer Medienzusätze**

Weitere Medienzusätze, welche in der Literatur als Morphologie-beeinflussend beschrieben werden, sind für auf ihre Möglichkeit hin auch *S. commune* in seiner Morphologie zu verändern, untersucht worden. Die *A. niger* Stämme bildeten kleinere und länglichere Pellets, wenn die Osmolarität in der Kultursuspension gesteigert wurde (Wucherpennig et al. 2011). *S. commune* zeigte keine entsprechende Veränderung. Wucherpennig et al. (2011) begründeten die Veränderung der Morphologie mit einer verlängerten Zeit der Auskeimung aus den Sporen und damit assoziierten Veränderung der anschließenden Agglomerationsschritte. Dieser Vergleich zeigt nochmals, dass die Hyphen von *S. commune* nach der Homogenisierung zu Beginn der Wachstumsphase nicht aggregieren, denn es müsste ein ähnliches Verhalten der Morphologie mit Zunahme der Osmolarität vorliegen. Wenn die Erhöhung der Osmolarität die initiale Wachstumsphase verlängert, so können die Hyphen erst verzögert mit den auskeimenden Hyphenschläuchen aggregieren, wodurch mehr, aber kleinere Pellets entstehen.

Auch ist es plausibel, dass die erhöhte Salzkonzentration die Morphologie von *S. commune* nicht verändert, da die Hyphenoberfläche von *S. commune* ungeladen ist. Diese enthält nur 1,3- $\alpha$ -D-Glucan, Glycogen sowie Chitin verknüpft an 1,3- $\beta$ -D-Glucan (Wessels et al. 1983). So kann sich die Oberflächenladung nicht verändern und zu An- bzw. Abstoßungsreaktionen der Hyphen führen. Bei geladenen Pilzsporen hingegen können sich durch Änderung der Ladungsanteile auf der Oberfläche bzw. an der Grenzfläche Veränderungen in der Sporenaggregation ergeben.

## **Einfluss der Medienzusätze und Korrelation mit der Produktivität**

Die Anzucht von Pellets mit Biomassedichten über etwa  $1 \mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mmP}^3$  wirkte sich nachteilig auf die Produktbildung von *S. commune* aus, denn bei größeren Werten stieg die pelletvolumen-spezifisch gebildete Polysaccharidmenge nicht mehr proportional zur Biomassedichte an (Abb. 3.35). Dies deutet auf einen verminderten Massentransport bzw. eine verringerte Substratversorgung mit zunehmender Biomassedichte hin. Analog zeigten Hille et al. (2005) für *A. niger*, dass der Sauerstoffkonzentrationsgradient für dicht gewachsene Pellets mit einer durchschnittlichen Biomassedichte von  $90 \mu\text{g}/\text{mm}^3$  dafür sorgt, dass die Sättigung auf eine Distanz von nur 100  $\mu\text{m}$  von Sättigungskonzentration auf Null zurück geht. Bei

einer durchschnittlichen Biomassedichte von  $18,1 \mu\text{g}/\text{mm}^3$  hingegen betrug diese Distanz über den Pelletradius bis zu  $600 \mu\text{m}$ . Diese weniger dicht gewachsenen Pellets werden somit auch noch in tiefer liegenden Schichten mit Substrat versorgt. Zwar lassen sich mit aufwendigen Verfahren kritische Pelletdurchmesser bestimmen, wie z.B. von Driouch et al. (2011) für *A. niger*. Wird jedoch insbesondere auf die Produktivität oder Ausbeute Wert gelegt, so bleibt zu berücksichtigen, dass die dichter gewachsene Biomasse auf weniger Raum auch entsprechend mehr Produkt bilden kann und dass die dichteren Pellets wiederum Vorteile für den Stoffeintrag in die Gesamtsuspension mit sich führen.

Typische Werte für den kritischen Pelletdurchmesser liegen in Abhängigkeit der Pellettdichte bei etwa 50 bis  $200 \mu\text{m}$  (Nielsen 1996; Wucherpfennig et al. 2010). Da die Biomassedichte der Pellets von *S. commune* im Vergleich zu *A. niger* gering ausfällt, konnte auch mit großen Pellets von *S. commune* noch eine vergleichsweise hohe Produktivität erzielt werden und der kritische Pelletdurchmesser liegt für *S. commune* vermutlich im Bereich hoher Pelletdurchmesser.

Veiter et al. (2018) liefern eine Zusammenfassung verschiedener aktueller Methoden zur Beeinflussung der Morphologie hinsichtlich einer Produktivitätssteigerung für unterschiedlichste Stämme filamentöser Pilze.

### **Einfluss von konzentriertem Medium**

Die Kultivierung von *Aspergillus niger* mit konzentriertem Medium (hohe Pepton-, Glucose- und Stärkekonzentration) führte zur Bildung deutlich kleinerer Pellets verglichen mit einem Medium, in dem die genannten Bestandteile um den Faktor 10 geringer konzentriert waren. In beiden Medien führte außerdem der Zusatz von Weizenkleie zu noch kleineren Pellets bzw. zum Teil auch zu mycelförmigem Wachstum (Papagianni et al. 1999). Eine Erklärung für die Veränderung wurde nicht angegeben. Diese könnte auch durch eine damit assoziierte erhöhte Osmolarität zustande kommen, wie es bereits beschrieben wurde (Wucherpfennig et al. 2011).

Eine Veränderung der Morphologie in Richtung mycelartigen Wachstums wie bei Hosobuchi et al (1993) für *Penicillium citrinum* gezeigt, wurde für *S. commune* nicht gefunden. Es war nur die Rauheit der Pellets sowie die projizierte Pelletfläche erhöht.

Auch der sporenbildende Pilz *Rhizopus arrhizus* bildete Mycelien anstatt Pellets aus, wenn die Konzentration der komplexen Medienbestandteile erhöht wurde (Byrne und Ward, 1989). Was diese morphologischen Veränderungen auslöste wurde jedoch nicht weiter untersucht oder diskutiert.

Da bei *S. commune* durch erhöhte Salzkonzentration keine morphologischen Veränderungen stattfanden, die erhöhte Konzentration komplexer Medienbestandteile jedoch zu einer geringen Morphologieveränderung führte, liegt die Ursache dieser Veränderung scheinbar auf zellulärer Ebene. Die erhöhte Rauheit könnte z.B. durch ein beschleunigtes Wachstum im Pelletrandbereich verursacht worden sein. Möglicherweise könnte eine zu niedrige Konzentration von THE im Standardmedium dazu geführt haben, dass eine geringe Wachstumslimitierung aufgrund zu geringer Konzentration einzelner komplexer Bestandteile zum betrachteten Kultivierungszeitpunkt vorlag.

Die Wachstumsinhibierung durch hohe Glucosekonzentration konnte auch auf morphologischer Ebene beobachtet werden.

### **Einfluss der Homogenisierung**

Für jeden Pilzstamm muss die Homogenisierung neu untersucht werden, um optimale Bedingungen z.B. für eine hohe Produktbildung erreichen zu können oder zur Ermittlung von robusten Prozessparametereinstellungen, welche die reproduzierbare Ausbildung einer bestimmten Morphologie ermöglichen. Die Homogenisierung von *S. rolfssii* und *S. commune* mit den gleichen Einstellungen vorzunehmen ist daher möglicherweise nicht angebracht. So zeigten mittels statistischer Versuchsplanung vorgenommene Untersuchungen der Homogenisierungsparameter Drehzahl und Dauer der Homogenisierung, dass bei Überimpfen von erster auf die zweite Vorkultur von *S. rolfssii* diese Parameter nicht signifikant waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die Homogenisierung von Luftmycel von *S. rolfssii* zum Beimpfen der ersten Vorkultur wurde herausgefunden, dass die Änderung morphologischer Parameter recht gering ausfällt und fast ausschließlich von der Änderung der Drehzahl abhängig ist (Ergebnisse nicht gezeigt). Gegensätzliche Beobachtungen wurden bei Homogenisierung von *S. commune* gemacht. Zum Teil wird jedoch für verschiedene Glucan-bildende Organismen die gleiche Homogenisierung durchgeführt (Rau et al. 1992). In jedem Fall wurde die Homogenisierung in der Literatur bisher nicht detailliert



beschrieben und der Einfluss der Homogenisierung weder auf die klassischen Kultivierungsparameter noch auf die Morphologie wurde bisher erfasst. Die erste Vorkultur im Schüttelkolben wurde in der Regel mit nicht homogenisiertem Mycel beimpft, sodass in diesem Stadium keine Kontrolle vorlag (Rau et al. 1990; Rau et al. 1992; Rau and Brandt 1994).

Es existieren nur zwei Literaturquellen, die eingehendere Untersuchungen zur Homogenisierung von Kultursuspension filamentöser Pilze beschreiben. Darin sind jedoch keine Beziehungen zur Morphologie beschrieben. Bei Papagianni et al. (1999) ist für die Homogenisierung der Pellets von *A. niger* mit einem Ultra Turrax eine Homogenisierungsdauer von 45 s beschrieben, um das Mycel nicht zu stark zu schädigen. In einer Oberflächenfermentation konnte mit homogenisierter Suspension aus Vorkultivierung mit großen Pellets (durchschnittlicher Pelletdurchmesser 2,5 mm) die gleiche Enzymaktivität erreicht werden wie bei Homogenisierung einer Vorkultur, die kleine Pellets und freie Mycelien enthielt. Dies wurde trotz deutlich geringerer Biotrockenmassekonzentration im Inokulum, in dem vor Homogenisierung die großen Pellets vorlagen, erreicht. (Es wurde das gleiche Volumen als Inokulum eingesetzt).

Ebune et al. (1995) zeigten, dass die Produktbildungsrate zu Anfang der Kultivierung mit *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 geringer war, wenn das Inokulum länger homogenisiert wurde. Jedoch wurde auch festgestellt, dass zu einem späteren Zeitpunkt in der Kultivierung (nach 36 h) die Produktbildung mit zunehmender Dauer der Homogenisierung anstieg. Wie Ebune et al. (1995) es für *A. niger* zeigten, konnte auch für *S. commune* bei Kultivierung in Hauptkultur gezeigt werden, dass bei längerer Homogenisierung des verwendeten Inokulums eine erhöhte Produktivität auftrat (Abb. 3.39).

In dieser Arbeit wurde für filamentöse Pilze am Beispiel von *S. commune* erstmals der Einfluss der Homogenisierung auf die Morphologie beschrieben. Am stärksten wirkte sich die Intensität der Homogenisierung (Drehzahl des Rotor-Stator-Systems im Mischaufsatz) auf die morphologischen Parameter aus. Die mechanische Zerkleinerung zwischen Rotor und Stator führt dazu, dass Pellets und Fragmente/Mycelien durch direkte mechanische Beanspruchung auseinander gerissen werden. Die Kräfte zwischen Rotor und Stator sind vergleichsweise stark, sodass Mycelien, die zwischen Rotor und Stator gelangen, vermutlich immer zerkleinert werden, da hier viele verschiedene Beanspruchungsarten wie Druck-,

Schub- und Prallbeanspruchung, aber auch Beanspruchung durch das umgebende Medium wirken. Die hohe Drehzahl bewirkt, dass das Mycel einer hohen Beanspruchungshäufigkeit im Rotor/Stator-System unterliegt. Zudem kommt es von außen mit zunehmender Drehzahl zu verstärkter Prall- und Scherbeanspruchung an Rotor und Stator. Aus den getroffenen Aussagen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Mit zunehmender Drehzahl werden in gleicher Zeit mehr Mycelien zerkleinert und es entstehen somit mehr Bruchstücke. Zudem nimmt dabei die Prall- und Scherbeanspruchung zu und somit entstehen ebenfalls mehr Fragmente. Haben die Fragmente eine bestimmte Größe erreicht, so werden sie vermutlich kaum noch weiter zerkleinert, da kleine Partikel deutlich fester sind als größere Partikel. Zudem könnte mit noch weiter zunehmender Intensität der Zerkleinerung auch die (mehrfache) Schädigung überproportional zu, die ein Absterben der gebildeten Mycelien verursacht haben könnte. Es wird also bei einer bestimmten Drehzahl voraussichtlich ein Maximum an lebensfähigen Hyphenfragmenten erreicht, die zu Pellets heranwachsen können. So wurden im Kultivierungsverlauf mehr aber dafür kleinere Pellets gebildet. Bei hoher Drehzahl spielt die Homogenisierungsdauer bezüglich der ausgebildeten Morphologie in der anschließenden Kultivierung keine Rolle mehr, da die Effekte der Homogenisierungsdauer dann vermutlich aufgrund der häufigeren Beanspruchungen durch das Rotor-Stator-System überlagert werden. Um das eigentliche Zerkleinerungsverhalten des Systems umfassend zu charakterisieren, müssen die Größen Beanspruchungsart, Beanspruchungshäufigkeit und Beanspruchungsenergieverteilung jedoch genauer untersucht werden und bekannt sein.

Wessels et al. (1983) zeigten, dass bei Homogenisierung mittels X-Press nur die Hyphenspitzen von *S. commune* zerstört wurden, die sich im Wachstum befanden, nicht jedoch diejenigen, welche nicht mehr wuchsen. Es wurde postuliert, dass dies an der losen Struktur der Hyphenspitzen während des Wachstums liegt. Ein Vergleich ist aufgrund der durch die unterschiedlichen Homogenisierungsmethoden wirkenden Kräfte schwierig. Dass durch die in dieser Arbeit vorgenommenen Homogenisierungsmethoden nur Hyphenspitzen abgeschert werden, kann jedoch ausgeschlossen werden. Denn wie die Morphologieanalyse zeigte, wurden auch große Pellets zu kleinsten Fragmenten zerkleinert.

Für *T. reesei* wurde der Einfluss auf die Morphologie untersucht, wenn starker Scherstress auf das Mycel ausgeübt wurde. Dazu wurden bestehende Mikroskopie- und Bildanalysesysteme verfeinert. Es konnte gezeigt werden, dass damit eine Unterscheidung des Pilzes vorgenommen werden konnte, wenn dieser unterschiedlichen Scherbelastungen ausgesetzt wurde und welchen Einfluss dies auf die Morphologie hatte (Hardy et al. 2017).

#### **4.3 Automatisierung der Mikroskopie**

Um die statistische Aussagekraft zu erhöhen, müssen ggf. noch mehr Aufnahmen gemacht werden, da bei 1200 Bildern bei den gewählten Durchflussraten und Belichtungszeiten nur zwischen minimal 108 und maximal 154 Pellets aufgenommen wurden. Vor dem Hintergrund der sich fortlaufend entwickelnden Computertechnologie stellen die dabei generierten Datenmengen zukünftig jedoch kaum eine Limitierung mehr da.

Die hier gewählte Methode zur automatischen Untersuchung kommt ohne eine Veränderung der Pellets aus. Es lässt sich für unterschiedliche Morphologien leicht adaptieren, indem z.B. die Maße der Durchflussskivette geändert werden. Es wurde analog zum bereits vor einigen Jahren beschriebenen Verfahren von Treskatis et al. (1997) entwickelt. Andere Verfahren sind deutlich aufwendiger und machen die Bearbeitung der Probe notwendig, was deutliche Veränderungen an den Pellets hervorrufen kann und wiederum einen zusätzlichen zeitlichen Aufwand bedeutet (Posch et al. 2012). Vorteil gegenüber Verfahren, die eine Probenbearbeitung benötigen, ist, dass es zur Mikroskopie im Bypass genutzt werden kann. Eine Mikroskopie direkt im Reaktor ist nicht möglich, wie am Ende des Abschnitts eingehend diskutiert wird, auch wenn bereits online-Mikroskopie-Verfahren existieren (Bluma et al. 2010).

Nachteil des Durchflussverfahrens ist, dass die beiden am häufigsten untersuchten Parameter, projizierte Pelletfläche und Pelletrauheit, die im Fall von *S. commune* in deutlichem Zusammenhang mit der Produktivität stehen, für Abweichungen von der manuellen Mikroskopie anfällig sind. Diese Abweichung könnte jedoch anhand eines Vergleichs zwischen manueller Mikroskopie und automatischer Mikroskopie (bei einer festgelegten Durchflussrate) von derselben Probe mit hohem Stichprobenumfang

ermittelt werden. Die Ergebnisse der automatischen Mikroskopie könnten dann über einen Faktor korrigiert werden. Für verschiedene Morphologien müsste das System auf diese Weise jeweils kalibriert werden und wäre somit ebenfalls für eine breite Anwendung geeignet.

Ein Vergleich mit anderen Verfahren ergibt, dass die Mikroskopie unter allen Verfahren, das in der Forschung am häufigsten angewandte Verfahren zur Untersuchung der Pilzmorphologie ist. Industrielle bzw. kommerzielle Verfahren zur automatischen Morphologieanalyse sind unterdessen nicht bekannt.

Die Messzeit bzw. die Anzahl der aufgenommenen Objekte je Zeiteinheit (Durchsatz) des entwickelten Verfahrens stimmt in etwa mit anderen halb-automatischen Systemen überein (Junker 2006). Ein direkter Vergleich des Verfahrensdurchsatzes ist jedoch schwierig, da der Durchsatz auch von der Größe der Bildausschnitte, also vom gewählten Equipment, und von der Größe der Pellets, d.h. vom Organismus und dessen Anzuchtbedingungen abhängig ist.

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Mikroskopie mit sich davon prinzipiell unterscheidenden Verfahren verglichen. Da die FBRM-Methode (*Focused Beam Reflectance Measurement*) bereits eingesetzt wurde, um die Morphologie von filamentösen Pilzen zu untersuchen, wurde diese Methode in Voruntersuchungen, die zu dieser Arbeit geführt haben, getestet. Mit diesem Messprinzip, mit dem die Sehnenlängen gemessen werden, können jedoch keine Aussagen über primäre morphologische Parameter getroffen werden. Letztendlich lassen sich hiermit nur Partikelgrößenverteilungen ermitteln. Der Sensor wurde zu Testzwecken im Fermenter eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass die gemessenen Partikelgrößenverteilungen stark von den Prozessparametern wie Drehzahl und/oder Begasungsrate abhängig sind und somit Veränderungen des Prozesses zu Veränderungen an den gemessenen Größenverteilungen führen (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit kann keine prozessunabhängige Untersuchung erfolgen. In der Literatur ist die Verwendung der FBRM-Sensorik daher wohl auch nur für die Anfangsphase von Kultivierungen beschrieben, in der z.B. die Auskeimung von Pilzsporen beobachtet wird (Grimm et al. 2004; Kelly et al. 2006). In dieser Phase verändern sich Prozessparameter wie z.B. die Viskosität noch gering, sodass eine Rückkopplung des Prozesses nicht zur Veränderung der aufgenommenen Sehnenlängen-verteilungen führt. Vorteil des FBRM-Verfahrens ist jedoch, dass es online bzw. im Reaktor eingesetzt werden kann.

Es existieren mittlerweile jedoch auch online-Mikroskopie Verfahren im Reaktor (Bluma et al. 2010; Galindo et al. 2005). Diese können jedoch aufgrund der Dichte der Pellets nicht für die Untersuchung der Pilzmorphologie verwendet werden, da z.B. bei *S. commune* die Pellets so dicht aneinander vorliegen, dass diese nicht vereinzelt betrachtet werden können. Es ist immer eine Verdünnung notwendig. In einem Bypass mit entsprechender Probenverdünnung sind diese Verfahren jedoch einsatzfähig. Vom Messprinzip unterscheiden sich diese Verfahren nur wenig vom selbst entwickelten Verfahren.

Ähnlich wie bei der FBRM-Methode kann auch die Laserbeugung, die bereits zur Untersuchung filamentöser Pilze herangezogen wurde, nur eine Aussage über enthaltene Partikelgrößenverteilungen treffen. Dabei sind auch hier nur Untersuchungen bis etwa zu einem Partikeldurchmesser von 1000 µm möglich (Wucherpennig et al. 2011). Die Laserbeugung kann auch als online- oder at-line Methode genutzt werden. Zudem müssen Lichtbrechungsindexe bekannt sein. Der Einsatz als online-Methode ist jedoch ähnlich wie bei der FBRM-Methode eher begrenzt, da Rückkopplungen des Prozesses zu erwarten sind. Somit ist die Methode weder zur Prozessentwicklung noch zur Prozesssteuerung als online-Methode geeignet.

Posch et al. (2013b) schlagen für eine online Messung der Biomassekonzentration von Fraktionen mit bestimmten Morphologien (kleine Mycelcluster, große Mycelcluster, Pellets) die Dielektrizitätsspektroskopie (multifrequent) vor. Sie hatten für den Pilz *Penicillium chrysogenum* eine Regression der Biomassekonzentrationen bestimmter Morphologiefractionen mit den Werten aus der Dielektrizitätsspektroskopie vorgenommen und erhielten dabei sehr gute Korrelationen und Vorhersagen aus den PLS-Modellen (*partial least square analysis*, eine Methode der multivariaten Datenanalyse). Jedoch kann auch die online Messung mittels Dielektrizitätsspektroskopie die vollständige Morphologieanalyse nicht ersetzen. In dieser Arbeit wurde ebenfalls die multivariate Datenanalyse verwendet. Dabei wurden Zusammenhänge wie z.B. die der pelletvolumen-spezifischen Produktivität in Abhängigkeit der projizierten Pelletfläche betrachtet (Abb. 3.26). Im Vergleich zu den Arbeiten von Posch et al. (2013b) wurden in dieser Arbeit diskrete morphologische Parameter verwendet, um die Biotrockenmassekonzentration vorherzusagen. Im Vergleich zu der von Posch et al. (2013b) verwendeten Methodik, lässt die in dieser

Arbeit gewählte Methodik zur Modellierung der Biotrockenmassekonzentration, Rückschlüsse auf quantitative Zusammenhänge zwischen Morphologie und Biotrockenmassekonzentration zu. Die Gleichungen zur Modellierung der Biotrockenmassekonzentration im Kultivierungsverlauf konnten je nach gewähltem Kultivierungsverfahren angepasst werden.

Für die Polysaccharidkonzentration konnte jedoch keine entsprechend gute mathematische Korrelation morphologischer Parameter über den gesamten Kultivierungsverlauf hinweg in unterschiedlicher Kultivierungsführung gefunden werden. Eindeutige Struktur-Eigenschafts-Beziehungen (Morphologie-Polysaccharidkonzentration) konnten jedoch auch hier festgestellt werden (vgl. Abb. 3.24, Abb. 3.25, Abb. 3.26).

Vaidyanathan et al. (2002) untersuchten den Einfluss der Morphologie auf die Bestimmung der Biomassekonzentration mittels Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIR). Die NIR-Spektren des Mycels bzw. der Biomasse werden durch morphologische Veränderungen beeinflusst. Zur Aufdeckung dieser Zusammenhänge wurde die PCA verwendet. Die Untersuchung von NIR-Spektren der Biotrockenmasse zeigte Korrelationen zwischen der spektralen Information und den verschiedenen morphologischen Formen. Die NIR-Spektren können somit verwendet werden Morphologie-verwandte Informationen zu erhalten. In dieser Arbeit wurde als online-Verfahren auch die Messung der optischen Dichte im Bioreaktor untersucht. Es konnte keine Korrelation mit morphologischen Parametern von *S. commune* festgestellt werden (Abb. 3.53), da vermutlich die Anströmung in der Fokusebene und das Bewachsen des Sensors prozessspezifische Fehlsignale und Signaländerungen hervorrufen. Die aufgenommene optische Dichte deutet jedoch darauf hin, dass bei Abwesenheit prozessspezifischer Signalbeeinflussung eine Abschätzung der Biomassekonzentration mittels optischer Dichtemessung möglich wäre. Wie oben bereits kurz beschrieben, wurde stattdessen gezeigt, dass mit verschiedenartigen Kombinationen aus morphologischen Parametern auch eine gute Abschätzung der Biotrockenmassekonzentration möglich ist. Plausibel ist dabei, dass nur die Parameter projizierte Pelletfläche, Pelletkonzentration und Grauwert der Pellets eine entsprechende Modellierung ermöglichen. Jedoch gibt es keine einheitliche Formel zur Modellierung der Biomasse von *S. commune* und es ist je nach Art der Prozessführung eine andere Kombination notwendig. Dies wird begreiflich, wenn z.B. die Eigenschaft des Grauwerts betrachtet wird. Dieser verändert sich bei größeren Pellets kaum noch,

da es zur Schattenbildung in der Mitte der Pellets kommt. Dies ist somit eine durch die Mikroskopie bedingte Eigenschaft und wird nicht von den Pellets hervorgerufen.

Für alle Sensortechniken, die zur online-Analyse in Frage kommen, ist anzumerken, dass *S. commune* schnell Oberflächen bewachsen kann und es somit leicht zu Verfälschungen der aufgenommenen Signale kommen kann. Eine offline-Vermessung der entsprechenden Proben ist daher vorzuziehen.

Sollen weitere morphologische Eigenschaften wie Fraktale untersucht werden, so ist auch dazu die Mikroskopie notwendig, die sich – wie bereits beschrieben – insbesondere für *S. commune* nur als offline-Methode eignet (Papagianni 2006).

Auch klassische Methoden aus der Partikelgrößenbestimmung wie z.B. Sinkgeschwindigkeitsmessungen (Photosedimentation, Röntgensedimentation), Scheibenzentrifugation, Siebverfahren, Elektronen- oder Rasterkraftmikroskopie, elektrische Feldstörung (coulter counter), Streulichtverfahren (z.B. Beugungsspektrometrie oder FBRM-Methode), Oberflächenmessverfahren (Photometrie), Ultraschallspektroskopie, etc. können zur Morphologieanalyse oder Analyse einzelner morphologischer Parameter genutzt werden und somit ggf. den messtechnischen Aufwand reduzieren, um ausreichende Ergebnisse für eine spezifische Anwendung zu erhalten.

Weiter und Herwig (2019) führten zudem eine Standard-Durchflusscytometrie zur Identifizierung vitaler Pelletbereiche ein. Die Methodik ist aufgrund des unumgänglichen Präparationsprozesses und dabei potenziell auftretender Veränderungen an der Morphologie nicht als adäquate at-line Methode geeignet.

Vidal-Diez de Ulzurrun et al. (2019) entwarfen ein Bildanalysesystem (*fungal feature tracker*, FFT), das jedoch hauptsächlich zur mikromorphologischen Untersuchung geeignet ist. Vidal-Diez de Ulzurrun et al. (2019) testeten das System auch erfolgreich daraufhin es zur quantitativen morphologischen Charakterisierung verschiedener Pilzstämme einzusetzen. Die Untersuchung und ein Vergleich der Ergebnisse dieses Systems mit der in dieser Arbeit entwickelten Bildauswerteroutine könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

#### 4.4 Polysaccharidbildung bei reproduzierbarer Morphologie

Die Morphologie von *S. commune* in Reaktorkultivierung reproduzierbar einzustellen, eröffnete die Möglichkeit die Produktivität in Abhängigkeit der Morphologie genauer auszuwerten (Kap. 3.4.2). Bezogen auf ihre Biomasse bildeten eindeutig kleine Pellets am meisten Polysaccharid (vergleiche zum Beispiel Abb. 3.25 oder Tab. 3.7). In der Literatur wurden bisher keine Untersuchungen zur Abhängigkeit der Polysaccharidproduktion filamentöser Pilze von der Pelletgröße beschrieben. Vor dem Hintergrund der Transportlimitierungen wurde für andere Pilze jedoch ein kritischer Radius berechnet (Hille et al. 2005; Nielsen 1996). Dies ist eingehend in Kapitel 4.2 diskutiert.

Auch die Entstehung von Pelletfragmenten im Kultivierungsverlauf konnte in Reaktorkultivierung nochmals genauer untersucht werden. Bereits im Schüttelkolbenmaßstab fiel auf, dass Pelletfragmente entstanden. Bei genauer Analyse der morphologischen Parameter fiel auf, dass es sich um Ablösungen der Hyphenbündel auf der Pelletoberfläche handelte. Ähnliche Beobachtungen machten auch Paul et al. (1999) bei *A. niger*. Sie vermuteten, dass die Hyphen an der Pelletoberfläche aufgrund von Alterung und Vakuolenbildung leichter abgeschert werden können. Papagianni (2004) zeigte, dass gebildete Fragmente wieder zu neuen Pellet anwachsen können. Park et al. (2002a) zeigten für den Pilz *Cordyceps militaris*, dass auch hier Fortsätze der Pellets mit zunehmender Dauer der Kultivierung abgeschert werden, was sich wie auch für *S. commune* in einer reduzierten Rauigkeit der Pellets äußerte. Die Untersuchungen von Park et al. zeigten auch, dass die Pelletkonzentration konstant blieb, die abgescherten Fragmente somit abgebaut wurden. Mit zunehmender Begasungsrate wurden vermehrt Hyphen abgeschert. Sie erklärten die beobachteten Effekte somit durch die hydrodynamischen Effekte, durch vermehrte Vakuolenbildung und eine dadurch verringerte Hyphenstabilität. Ob aus den gebildeten Fragmenten wiederum jeweils einzelne Pellets anwachsen oder durch Zusammenlagerung neue Pellets entstehen, hängt wiederum von den Umgebungsbedingungen und von den Oberflächeneigenschaften der Pellets ab (J. Zhang and Zhang 2015).



## Exobiopolymerproduktion in Abhängigkeit der vorliegenden Morphologie

In zahlreichen Publikationen wird die Exobiopolymerproduktion mit der jeweils vorliegenden Morphologie verglichen. So zeigten Park et al. (2002b) für *Cordyceps militaris*, der wie *S. commune* ebenfalls ausgehend von vegetativem Mycel in Flüssigkultur angezogen wird, dass bei mittlerer Begasungsrate (2 vvm) die kompaktesten Pellets entstanden und am meisten Exo-Biopolymer gebildet wurde. Die Abhängigkeit vom Energieeintrag bzw. der Begasungsrate wurde in dieser Arbeit nur in geringem Umfang untersucht (Tab. 3.3). Es zeigte sich auch für *S. commune*, dass bei kompakterer Morphologie mehr Polysaccharid gebildet wurde und die Polysaccharidbildung somit wachstumsgekoppelt ist. Größere Pellets von *S. commune* wiesen eine geringere Biomassedichte auf (vermutlich Wachstumsinhibierung im Kern der Pellets aufgrund von Substratlimitierung, siehe Abb. A.20) und bildeten weniger Polysaccharid. Eine Substratlimitierung führt somit nicht zu einer vermehrten Polysaccharidbildung. Dies konnte mittels der Morphologieanalyse nachgewiesen werden.

Gleiches wurde in einer weiteren Publikation von Park et al. (2002a) auch bei Untersuchung der Morphologie in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl für *Cordyceps militaris* gezeigt. Der Ertrag  $Y_{PS/X}$  fällt am höchsten aus, wenn kompakte Pellets gebildet werden. Somit wurde gezeigt, dass der Effekt unabhängig von den Kultivierungsparametern auftritt und somit eher abhängig von der ausgebildeten Morphologie ist. Jedoch sind die untersuchten Parameter Begasungsrate und Rührerdrehzahl nicht vollständig unabhängig voneinander. Denn die Variation der Rührerdrehzahl führt ebenfalls zu einer Veränderung des Sauerstoffs- bzw. Gaseintrags. In der Publikation von Park et al. (2002a) wird auch der Verlust der Hyphenfortsätze im Pelletaußenbereich beschrieben, jedoch nur für höhere Drehzahlen (300 /min). Zusammenhänge zwischen Rauheit und Viskosität wurden nicht beschrieben. Bei Kultivierung von *S. commune* wirkten Suspensionen, die für fünf Tage oder länger kultiviert wurden, augenscheinlich deutlich weniger viskos. Die verminderte Viskosität könnte dadurch verursacht worden sein, dass die Pellets in diesem Kultivierungszeitraum weniger rau sind, da sie weniger Hyphenfortsätze aufweisen (Abb. 3.48 und Abb. A.23, Abb. A.25). Sie verhaken sich weniger ineinander, wodurch die Viskosität der Suspension bei gleichbleibendem oder noch leicht steigendem Polysaccharidgehalt sinkt (Abb. 3.48). Ein interessanter Aspekt

hierzu wird auch von (Sinha et al. 2001a) erläutert. Die Viskosität der Fermentationsbrühe stieg in der exponentiellen Wachstumsphase von *Paecilomyces japonica* und damit einhergehender Zunahme der Pelletrauheit stark an. Die darauf folgende Abnahme der Viskosität wurde durch die Änderung der Pelletmorphologie in dieser Phase erklärt (geringere Rauigkeit). In dieser Phase (stationäre Phase mit geringerer Viskosität) stieg die Sauerstoffsättigung wieder an, was die weitere Exo-Biopolymerproduktion in dieser Phase ausgelöst haben könnte. Dies wurde in ähnlicher, wenn auch nicht so deutlich ausgeprägter Form bei *S. commune* beobachtet (Abb. 3.48), wenn auch ein Anstieg der Sauerstoffsättigung bei *S. commune* kaum auszumachen war (vgl. Abb. A.26).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Pellets von *S. commune* bei längerer Kultivierungsdauer die langen Hyphenfortsätze auf der Pelletoberfläche teilweise oder ganz verlieren (Abb. A.22, Abb. A.23, Abb. A.25; Kapitel 3.2.3.1.2). Ein ähnliches Verhalten wird in der Literatur von Wagner et al. (2004) für den Basidiomyceten *Ganoderma lucidum* beschrieben, der ein  $\beta(1,3)$ -Glucan bildet. *G. lucidum* bildete bei längerer Kultivierung (über 10 Tagen) lange Hyphenfortsätze aus, die sich in der Folge – insbesondere bei Zugabe von Glucose ablösten – und zu Pellets zweiter Generation anwuchsen. Ein ähnliches, wenn auch weniger stark ausgeprägtes Verhalten dieser Art, wurde auch für *S. commune* gefunden (Abb. 3.48 und Abb. A.23).

Am Schlauchpilz *P. japonica* wurde ebenfalls die Morphologie und die damit verbundene Exo-Biopolymer-Produktion untersucht. Mit zunehmender Saccharosekonzentration (von 20 auf 60 g/L) wurde die mittlere Pelletfläche von *Paecilomyces japonica* größer. Ähnlich wie bei *S. commune* wuchs zunächst eine haarähnliche Struktur am äußeren Pelletrand bis zum zweiten Tag der Kultivierung, anschließend wurde dieser Bereich wieder kleiner und die Pellets kompakter; das Wachstum im Pelletinneren nahm dann vergleichsweise stärker zu. Nach etwa 4 bis 6 Tagen der Kultivierung wurden die Hyphen in dieser Region wie bei *S. commune* „abrsiert“. Die haarähnliche Struktur (und die Rauigkeit) der Pellets nahm mit der initialen Saccharosekonzentration zu; ein ähnliches Verhalten wie in konzentriertem Komplexmedium bei *S. commune*. Der ursächliche Mechanismus ist nicht bekannt. Die Rauigkeit der Pellets nahm von Beginn der Kultivierung an (bis etwa Tag 3 bis 5 der Kultivierung) kontinuierlich zu und anschließend kontinuierlich ab. Dies wurde in dieser Arbeit in ähnlicher Weise bei Kultivierung von *S. commune* festgestellt.

Bzgl. der Rundheit der Pellets mit zunehmender Substrat-Konzentration wurde keine Veränderung beobachtet. Generell wurden die Pellets mit zunehmender Kultivierungsdauer runder (Rundheit nach 24 h bei knapp 0,6 und nach 72 h etwa bei 0,7). Die Konzentration des Exo-Biopolymer nahm kontinuierlich zu. Auch nachdem die Konzentration der Biomasse nicht mehr weiter zunahm (stationäre Phase) und die Pellets nach 10 bis 12 Tagen bereits in Fragmente zerfielen. Bei höherer Vergrößerung wurden in dieser Phase der Kultivierung Einkerbungen an der Myceloberfläche gefunden, was für die Exo-Biopolymersekretion in der stationären Phase verantwortlich sein könnte. Pellets von mittlerer Rauigkeit und mittlerer Haar-ähnlicher Struktur sind den Autoren zufolge für eine vermehrte Exo-Biopolymer-Produktion notwendig. Angaben spezifischer Werte fehlen jedoch. Es gibt jedoch einige Parallelen zur Kultivierung von *S. commune* (Sinha et al. 2001b).

Lee et al. (2004) zeigten, dass der Basidiomycet *Grifola frondosa* am meisten Exo-Biopolymer bildete, wenn dieser in Form von Pellets mit langen Hyphenfortsätzen wuchs. Die Morphologie war ähnlich derer von *S. commune* bei Zusatz von hohen Talkpartikelkonzentrationen. Durch diese Form könnte die Versorgung mit Nährstoffen bis weiter ins Pelletinnere besser gewährleistet sein, als bei kompakter kugelförmiger Form auf der Pelletoberfläche. Durch die bessere Substratversorgung könnte dadurch die Produktbildung verbessert sein.

### **Optimierung der Exobiopolymerproduktion mittels statistischer Versuchsplanung**

Wang und Lu (2005) beschreiben die Optimierung von Prozessparametern für die Exobiopolymerproduktion von *Boletus spp.* ACCC 50328 mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung. Einflüsse auf die Morphologie oder Zusammenhänge zwischen Exobiopolymerproduktion und Morphologie von *Boletus spp.* ACCC 50328 wurden jedoch nicht untersucht. Sie zeigten, dass bei mittlerer Inokulumkonzentration die maximale EPS-Konzentration erreicht wurde und die EPS-Konzentration bei hoher Inokulumkonzentration wieder abnahm. Bei *S. commune* wurde beobachtet, dass mit steigender Inokulumkonzentration die Pelletkonzentration anstieg und mit steigender Pelletkonzentration die Raum-Zeit-Ausbeute zunahm (vgl. Abb. 3.12 und Abb. 3.15). Es wurde jeweils ein Maximum bei hohen Konzentrationen erreicht. Die Morphologiekontrolle lässt hier die Schlussfolgerung zu, dass die Limitierung im

Stoffeintrag der Gesamtsuspension liegt und nicht in der Limitierung einzelner Pellets. Bei Wang und Lu (2005) kann zwar eine Limitierung als Ursache für die geringere EPS-Konzentration bei Verwendung hoher Inokulumkonzentrationen vermutet werden, nicht jedoch wie diese Limitierung zustande kommt.

Feng et al. (2010) optimierten das Medium zur Kultivierung von *Lentinus edodes* und steigerten mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung die Exo-Biopolymerproduktion um das 2,5-fache. Von den Autoren wird auf einen wachstumsgekoppelten Zusammenhang hingewiesen.

Zwar wird in der Literatur die statistische Versuchsplanung als wichtiges potenzielles Werkzeug zur Identifizierung von Schlüsselfaktoren in der Morphologiebeeinflussung erwähnt, jedoch wurde die Morphologie bisher nicht mit Methoden der statistischen Versuchsplanung untersucht (Posch et al. 2013a).

Für *S. commune* ist lediglich die Optimierung des Mediums zur Schizophyllanproduktion mit *Schizophyllum commune* NRCM mittels statistischer Versuchsplanung bekannt (Kumari et al. 2008). Im Versuchsplan (CCC-Versuchsplan) wurden vier Faktoren (drei Medienbestandteilen) in Kombination mit der Inokulumkonzentration untersucht. Die ausgebildete Morphologie als Ergebnisgröße blieb jedoch unberücksichtigt. Da sich die Produktkonzentration mit dem berechneten Modell sehr gut vorhersagen ließ, scheint die Morphologie des untersuchten Stamms mit den untersuchten Parametern recht gut einstellbar zu sein. Da auch die Inokulumkonzentration gezielt eingestellt wurde, scheint dies plausibel; wurde die Inokulumkonzentration in dieser Arbeit doch als äußerst wichtiger Faktor zur reproduzierbaren Kultivierungsführung und Einstellung der Morphologie identifiziert. Die Untersuchungen von Kumari et al. (2008) zeigten auch konkret, dass bei höherer Inokulumkonzentration mehr Schizophyllan, bei sehr hoher Konzentration dann jedoch wieder etwas weniger Schizophyllan gebildet wurde. Dieser Zusammenhang wurde auch für den in dieser Arbeit untersuchten Stamm aufgedeckt, wobei zusätzlich Informationen über die mit dieser Beobachtung zusammenhängenden morphologischen Eigenschaften identifiziert werden konnten (vgl. Abb. 3.16, 3.17, 3.20, 3.21). Die untersuchten Inokulumkonzentrationen waren jedoch geringer als die in dieser Arbeit eingesetzten Inokulumkonzentrationen, sodass kein direkter Vergleich möglich ist.

Des Weiteren wurden Methoden der statistischen Versuchsplanung bei Pilzen fast ausschließlich zum Screening und zur Optimierung des Mediums hinsichtlich einer Steigerung der Produktkonzentration untersucht (Burkert et al. 2004; Haltrich et al. 1994; Muralidhar et al. 2001; Rajendran et al. 2007).

Gerlach et al. (1998) verwendeten ein neuronales Netzwerk mit Clusteranalyse, um den Einfluss von Reaktorsystemen auf die Morphologie von *Aspergillus awamori* zu beschreiben. Auch mit dieser Methode konnten plausible Struktur-Eigenschafts-Beziehungen hergestellt werden.

Weuster-Botz (2000), empfiehlt die Screeningversuche mittels genetischen Algorithmus vorzunehmen und zur Optimierung die statistische Versuchsplanung einzusetzen, da Screeningversuche mittels statistischer Versuchsplanung bei der Korrelation vergleichsweise geringe Regressionskoeffizienten erzielen (unimodulare *response surface*). Mit dem genetischen Algorithmus hingegen können sehr große Spannen der Variablen untersucht werden und es müssen weder Screeningversuche durchgeführt werden noch Annahmen über die Topologie der *response surface* getroffen werden. Jedoch ist das globale Optimum mittels genetischem Algorithmus aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten nicht genau zu ermitteln und hier ist daher die statistische Versuchsplanung im Vorteil.

### **Multivariate Datenanalyse in der Morphologieuntersuchung**

Ahamed und Vermette (2009) zeigten mit einem ANOVA-Test (ANOVA: Analysis of Variance) den Zusammenhang zwischen der Mikromorphologie und Cellulaseproduktion von *Trichoderma reesei* auf. So fanden sie, dass bei einer großen Gesamtmycelfläche und einer hohen relativen Anzahl an Hyphenspitzen eine vermehrte Cellulaseproduktivität (volumetrisch) vorlag. Da sich die Untersuchungen bei *S. commune* auf die Makromorphologie beschränkten, kann kein entsprechender Vergleich durchgeführt werden; jedoch kann aufgrund der Untersuchungen an *S. commune*, dessen Pellets bei höheren Biomassedichten und folglich bei mehr Verzweigungen und Hyphenspitzen vermehrt Polysaccharid bildeten, ein ähnlicher Zusammenhang durchaus vermutet werden.

Vaidyanathan et al. (2003) untersuchten mittels NIR-Spektrometrie die Biomasse von *Streptomyces fradiae*. Mittels PCA (Principal Component Analysis) konnten Sie die

Biomassekonzentration von *S. fradiae* vorhersagen. Dabei fanden Sie auch heraus, dass die gewonnenen Ergebnisse durch die vorliegende Morphologie beeinflusst werden. Sie schlugen daher vor die NIR-Spektroskopie auch zur Morphologieuntersuchung einzusetzen.

Auch Batch-Kultivierungen von *Penicillium chrysogenum* im 15-Liter-Maßstab wurden bereits mittels PLS-Analyse untersucht. Es wurde erkannt, dass die Modelle zur Vorhersage der Biomassekonzentration sensitiv auf ein Scale-up reagieren. Auch hierbei wurde vermutet, dass dies durch Veränderungen der Morphologie bei scale-up herbeigeführt wurde (Vaidyanathan et al. 2001).

Auch Posch et al. (2013b) untersuchten *P. chrysogenum* mittels multivariater Datenanalyse, um die Biomassekonzentration in Fraktionen verschiedener Morphologie des Stammes vorausszusagen. Im *Loadingplot* konnten sie zahlreiche Beziehungen zwischen variiertem Inokulumkonzentration und der Morphologie darstellen.

Auch für batch-Prozesse zur Hefenproduktion wird die Anwendung der multivariaten Datenanalyse berichtet (Wold 1998).

Weitere Untersuchungen der Makromorphologie mittels multivariater Datenanalyse sind in der Literatur nicht genannt.

Gurden et al. (1998) geben einen detaillierten Überblick über die multivariate Datenanalyse zur Anwendung in Industrieprozessen. Die Methode ist vor dem Hintergrund einer sich rasant entwickelnden Industrie 4.0 ein exzellentes und unerlässliches Werkzeug. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Kultivierung filamentöser Pilze über die Morphologieanalyse mit solchen Methoden steuerbar wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine fortgeschrittene automatische Bildanalyse in Verbindung mit Modellierungswerkzeugen wie der statistischen Versuchsplanung und der multivariaten Datenanalyse als leistungsfähige Methoden für eine qualitative Vorhersage der Produktivität genutzt werden können, genau wie erst kürzlich von Walisko et al. (2015) gefordert.

In zukünftige Untersuchungen der Morphologie von *S. commune* könnte auch deren Einfluss auf die Abtrennung der Biomasse z.B. mittels Querstromfiltration untersucht

werden. Zudem wäre eine weitere Optimierung der automatischen Morphologieanalyse zu einer direkten Prozessankopplung z.B. an eine kontinuierliche Kultivierung und deren Steuerung über die multivariate Datenanalyse ein interessanter Aspekt weiterer Untersuchungen.

## I Zusammenfassung

Die Morphologie filamentöser Pilze ist oft der entscheidende Faktor für die Produktivität in industriellen Prozessen. Die Reproduzierbarkeit des Prozesses oder die Realisierung kontinuierlicher Prozesse ist aufgrund einer unkontrollierten Morphologie nicht erreichbar. In dieser Arbeit wurde daher Morphologie-gestützt ein reproduzierbares Kultivierungsverfahren für den Basidiomyceten *Schizophyllum commune* DSM 6320 etabliert. Dazu wurde erstmals die statistische Versuchsplanung zur Beschreibung der Makromorphologie eines Pilzes eingesetzt. Die Morphologie-analyse konnte eingesetzt werden, um die Reproduzierbarkeit in aufeinander aufbauenden Kultivierungsschritten zu überprüfen. Sie wurde in Zusammenhang mit der reproduzierbaren Einstellung weiterer Kultivierungsparameter, z.B. der Biotrockenmasse oder der Exo-Polysaccharidkonzentration, gestellt (Struktur-Eigenschafts-Beziehung). Die morphologische Analyse ermöglichte ein frühzeitiges Erkennen von Abweichungen einer definierten Standardkultivierung. Eine Steuerung des Kultivierungsprozesses und ggf. eine Regelung mit der Analyse der Makromorphologie von *S. commune* wurde somit möglich.

Die Mikroskopie zur Bildaufnahme der Pellets von *S. commune* wurde einschließlich der Auswertung makromorphologischer Parameter erfolgreich automatisiert. Gleichzeitig zur beschleunigten Analyse aller makromorphologischen Parameter wurde dadurch auch eine sehr schnelle Analyse der Pelletkonzentration erzielt, die erfolgreich eingesetzt wurde, um die Biotrockenmassekonzentration abzuschätzen. Diese konnte über den gesamten Kultivierungsverlauf in grund-verschiedenen Kultivierungen ausschließlich mittels morphologischer Parameter dargestellt werden. Eine aufwendige gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration kann damit für gut charakterisierte und reproduzierbare Kultivierungsprozesse entfallen. Die Morphologie von *S. commune* wurde durch Medienzusätze erfolgreich verändert. Das Ziel, dadurch die Raum-Zeit-Ausbeute zu steigern, wurde durch Zugabe von Talkpartikeln erreicht. Im Vergleich mit einem *S. rolfsii*-Stamm wurde gezeigt, dass der Effekt stammabhängig auftrat. Die Morphologie konnte zum Erreichen einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute gezielt auch mittels Optimierung der Homogenisierung und der Biotrockenmassekonzentration bei Beimpfen eingestellt werden. Es wurden Struktur-Eigenschafts-Beziehungen für verschiedene Kultivierungsschritte beschrieben. Die höchste auf das Pelletvolumen bezogene Menge an Polysaccharid von  $2,6 \mu\text{g}_{\Delta\text{PS}}/\text{mmP}^3$  wurde von Pellets mittlerer Größe (ca. 2



mm<sup>2</sup>) und höherer Biomassedichte (etwa 2,5 µg<sub>BTM</sub>/mm<sub>P</sub><sup>3</sup>) gebildet. Bei Zunahme der Pelletgröße ging die pelletvolumen-spezifisch gebildete Menge an Polysaccharid zurück.

Das neuartige Verfahren könnte zur Kontrolle und Steuerung der Morphologie in industriellen Produktionsprozessen eingesetzt werden. Die Methodik könnte dabei auch hinsichtlich wirtschaftlicher Kenngrößen zur weiteren Optimierung genutzt werden.

## II Abstract

Morphology of filamentous fungi is often key factor of productivity in industrial bioprocesses. Reproducibility of these processes or realization of continuous processes can not be achieved as a result of this uncontrolled morphology. A reproducible cultivation of basidiomycota *Schizophyllum commune* DSM 6320 was developed by the analysis of its morphology. For this, the design of experiments approach could be used for the first time to describe the macromorphology of a fungus. Applying morphology analysis lead to validation of reproducibility of the cultivation process in all cultivation steps based on each other. In addition, morphology was correlated to cultivation parameters as bio dry cell weight (*bdw*) or polysaccharide concentration throughout different cultivation steps and phases. Analysis of morphology enabled an early detection of deviations from reproducible status of the cultivation. Therefore, control and adjustment of the cultivation process by macromorphological analysis of *S. commune* became practicable.

Microscopy and image capturing of pellets could be successfully automated including a fully computerized image evaluation system. Simultaneously, to accelerated analysis of all macromorphological parameters, a very fast detection of pellet concentration was enabled by this system and successfully used to estimate *bdw* which became predictable by morphological parameters solely throughout different cultivation processes. Thus, it became clear that laborious gravimetric analysis of *bdw* is omittable for reproducible cultivation processes well characterized.

Medium supplements successfully altered morphology of *S. commune*. By adding talc microparticles the aim to increase space-time yield could be reached. In comparison to *S. rolfsii* it could be shown that the effect of talc microparticles was strongly strain dependent. By optimizing homogenization and bio dry cell weight at inoculation, the morphology of *S. commune* tailor-made to reach maximum space-time-yield of polysaccharide. Structure-property correlations were identified in different steps of cultivation. Medium-sized pellets of about 2 mm<sup>2</sup> and of high bio dry cell weight density of about 2,5 µg<sub>BTM</sub>/mmP<sup>3</sup> formed the highest amount of polysaccharide with regard to volume of pellet (2,6 µg<sub>APS</sub>/mmP<sup>3</sup>). With an increase of pellet size, the amount of polysaccharide secreted per pellet-volume decreased.

The novel procedure could be applied to control and regulate morphology in industrial production processes. Method capabilities could be used for further optimization with regard to economic parameters.

### III Literatur

- Adams, HL and Thomas, CR (1988), 'The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms', *Biotechnology and Bioengineering*, 32 (5), 707-12.
- Ahamed, A. and Vermette, P. (2009), 'Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production', *Bioresource Technology*, 100 (23), 5979-87.
- Antecka, A., Bizukojc, M., and Ledakowicz, S. (2016), 'Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32 (193).
- Aketagawa, J., et al. (1993), 'Activation of limulus coagulation factor G by several (1→3)-β-D-glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations', *Journal of Biochemistry*, 113 (6), 683-86.
- Barry, D. J. and Williams, G. A. (2011), 'Microscopic characterisation of filamentous microbes: Towards fully automated morphological quantification through image analysis', *Journal of Microscopy*, 244 (1), 1-20.
- Bizukojc, M. and Ledakowicz, S. (2010), 'The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (1), 41-54.
- Bluhm, T. L., et al. (1982), 'Solid-state and solution conformation of scleroglucan', *Carbohydrate Research*, 100 (1), 117-30.
- Bo, G (2000), 'Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins', *Clinical Microbiology and Infection*, 6 (S3), 6-8.
- Bohn, J. A. and BeMiller, J. N. (1995), '(1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships', *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (2004), 'Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update', *Experimental Biology and Medicine*, 229 (5), 393-406.
- Box, George EP and Wilson, KB (1951), 'On the experimental attainment of optimum conditions', *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13 (1), 1-45.
- Burdach, Karl Friedrich (1817), *Ueber die Aufgabe der Morphologie*.
- Burkert, J. F. M., Maugeri, F., and Rodrigues, M. I. (2004), 'Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design', *Bioresource Technology*, 91 (1), 77-84.
- Cabaleiro, David R, et al. (2002), 'Comparison between the protease production ability of ligninolytic fungi cultivated in solid state media', *Process Biochemistry*, 37 (9), 1017-23.
- Chihara, G. (1984), 'Immunopharmacology of lentinan and the glucans', *EOS Rivista di Immunologia ed Immunofarmacologia*, 4 (2), 85-96.
- Coban, H. B., Demirci, A., and Turhan, I. (2015), 'Microparticle-enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production and evaluation of fungal morphology in submerged fermentation', *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Coban, H. B., Demirci, A., and Turhan, I. (2015a), 'Enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production in fed-batch and continuous fermentations in the presence of talcum microparticles', *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

- Coviello, T., et al. (2005), 'Scleroglucan: A versatile polysaccharide for modified drug delivery', *Molecules*, 10 (1), 6-33.
- Cox, P. W. and Thomas, C. R. (1992), 'Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis', *Biotechnology and Bioengineering*, 39 (9), 945-52.
- Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M., and Luyben, K. Ch A. M. (1998), 'Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation', *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (4), 409-19.
- Davison, Paul and Mentzer, Eric (1982), 'POLYMER FLOODING IN NORTH SEA RESERVOIRS', *Society of Petroleum Engineers journal*, 22 (3), 353-62.
- Domingues, F. C., et al. (2000), 'The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30', *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (5-6), 394-401.
- Driouch, H., Sommer, B., and Wittmann, C. (2010), 'Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production', *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (6), 1058-68.
- Driouch, H., et al. (2011), 'Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles', *Biotechnology and Bioengineering*.
- Dynesen, J. and Nielsen, J. (2003), 'Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation', *Biotechnology progress*, 19 (3), 1049-52.
- Ebune, A, Al-Asheh, S, and Duvnjak, Z (1995), 'Production of phytase during solid state fermentation using *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 in canola meal', *Bioresource Technology*, 53 (1), 7-12.
- Espinosa-Ortiz, Erika J, et al. (2016), 'Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives', *Chemical Engineering Journal*, 283, 553-71.
- Etschmann, M. M. W., et al. (2014), 'Improving 2-phenylethanol and 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone production with fungi by microparticle-enhanced cultivation (MPEC)', *Yeast*.
- Fang, Q-H., Tang, Y-J., and Zhong, J-J. (2002), 'Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*', *Process Biochemistry*, 37, 1375-79.
- Fariña, J. I., et al. (2009), 'Structural stability of *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126  $\beta$ -glucan with fermentation time: A chemical, infrared spectroscopic and enzymatic approach', *Journal of Applied Microbiology*, 106 (1), 221-32.
- Feng, Y. L., et al. (2010), 'Statistical optimization of media for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies', *Biochemical Engineering Journal*, 49 (1), 104-12.
- Fernandez-Lafuente, Roberto (2010), 'Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62 (3-4), 197-212.
- Fisher, RA (1935), *The design of experiments* (Oxford, England: Oliver and Boyd) xi+251.
- Fleming, Alexander (1929), 'On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzæ*', *British journal of experimental pathology*, 10 (3), 226-36.
- Foster, Jackson W (1949), 'Chemical activities of fungi', *Chemical activities of fungi*.
- Galindo, E., et al. (2005), 'Development of advanced image analysis techniques for the in situ characterization of multiphase dispersions occurring in bioreactors', *Journal of Biotechnology*, 116 (3), 261-70.

- Gerlach, S. R., et al. (1998), 'Influence of reactor systems on the morphology of *Aspergillus awamori*. Application of neural network and cluster analysis for characterization of fungal morphology', *Process Biochemistry*, 33 (6), 601-18.
- Gibbs, P. A., Seviour, R. J., and Schmid, F. (2000), 'Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions', *Critical Reviews in Biotechnology*, 20 (1), 17-48.
- Grimm, L. H., et al. (2004), 'Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia', *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (2), 213-18.
- Göğüs, N., et al. (2006), 'Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 in submerged cultures', *Biochemical Engineering Journal*, 32 (3), 171-78.
- Gura, E. and Rau, U. (1993), 'Comparison of agitators for the production of branched  $\beta$ -1,3-d-glucans by *Schizophyllum commune*', *Journal of Biotechnology*, 27 (2), 193-201.
- Gurden, S. P., Martin, E. B., and Morris, A. J. (1998), 'The introduction of process chemometrics into an industrial pilot plant laboratory', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 44 (1-2), 319-30.
- Haltrich, D., Laussamayer, B., and Steiner, W. (1994), 'Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii*: Effect of growth substrates and development of a culture medium using statistically designed experiments', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42 (4), 522-30.
- Hansen, G.H., et al. (2015), 'Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation', *Process Biochemistry*, 50, 1327-41.
- Hardy, N., et al. (2017), 'Advanced digital image analysis method dedicated to the characterization of the morphology of filamentous fungus', *Journal of Microscopy*, 266 (2), 126-40.
- Higashiyama, K., et al. (1998), 'Effects of mineral addition on the growth morphology of and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4', *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (12), 1815-19.
- Hille, A., et al. (2005), 'Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*', *Biotechnology and Bioengineering*, 92 (5), 614-23.
- Junker, B. (2006), 'Measurement of bubble and pellet size distributions: past and current image analysis technology', *Bioprocess Biosyst Eng*, 29, 185-206.
- Kaup, B. A., et al. (2008), 'Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example', *Biotechnology and Bioengineering*, 99 (3), 491-98.
- Kelly, S., et al. (2006), 'Effects of fluid dynamic induced shear stress on fungal growth and morphology', *Process Biochemistry*, 41 (10), 2113-17.
- Kelly, S., et al. (2006), 'Investigations of the morphogenesis of filamentous microorganisms', *Engineering in Life Sciences*, 6 (5), 475-80.
- Kershaw, M. J. and Talbot, N. J. (1998), 'Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis', *Fungal Genetics and Biology*, 23 (1), 18-33.
- Kisser, M., Kubicek, C. P., and Rohr, M. (1980), 'Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation', *Archives of Microbiology*, 128 (1), 26-33.
- Kossen, N. W. (2000), 'The morphology of filamentous fungi', *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 70, 1-33.

- Kulicke, W. M., Lettau, A. I., and Thielking, H. (1996), 'Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1-3)- $\beta$ -D-glucans', *Carbohydrate Research*, 135-43.
- Kumari, M., Survase, S. A., and Singhal, R. S. (2008), 'Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM', *Bioresource Technology*, 99 (5), 1036-43.
- Landini, G (2011), 'Fractals in microscopy', *Journal of Microscopy*, 241 (1), 1-8.
- Lange, P. and Keilhofer, G. (2004), 'Industrial biopolymers for oilwell drilling: Xanthan gum and scleroglucan - How both differ at elevated temperatures', *Erdoel Erdgas Kohle*, 120 (12), 174-78.
- Lecacheux, D., et al. (1986), 'Molecular weight of scleroglucan and other extracellular microbial polysaccharides by size-exclusion chromatography and low angle laser light scattering', *Carbohydrate Polymers*, 6 (6), 477-92.
- Lee, B. C., et al. (2004), 'Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*', *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (5), 369-76.
- Leterme, P., et al. (2005), 'Influence of the morphogranulometry and hydrophobicity of talc on its antisticking power in the production of tablets', *International Journal of Pharmaceutics*, 289 (1-2), 109-15.
- Lin, P. J., Scholz, A., and Krull, R. (2010), 'Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*', *Biochemical Engineering Journal*, 49 (2), 213-20.
- Lucatero, S., Galindo, E., and Larralde-Corona, C. P. (2004), 'Quantitative characterisation of the morphology of *Trichoderma harzianum* cultured in shake-flasks and containing Tween 40', *Biotechnology Letters*, 26 (1), 41-44.
- Maeda, Y. Y. and Chihara, G. (1971), 'Lentinan, a new immuno-accelerator of cell-mediated responses', *Nature*, 229 (5287), 634.
- Maeda, Y. Y., et al. (1988), 'Denaturation and renaturation of a  $\beta$ -1,6;1,3-glucan-, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses', *Cancer Research*, 48 (3), 671-75.
- Mandelbrot, Benoit B (1983), 'The fractal geometry of nature/Revised and enlarged edition', *New York, WH Freeman and Co.*, 1983, 495 p., 1.
- Max, Belén, et al. (2010), 'Biotechnological production of citric acid', *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (4), 862-75.
- McIntire, T. M. and Brant, D. A. (1998), 'Observations of the (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan linear triple helix to macrocycle interconversion using noncontact atomic force microscopy', *Journal of the American Chemical Society*, 120 (28), 6909-19.
- Metz, B, De Bruijn, EW, and Van Suijdam, JC (1981), 'Methods for quantitative representation of the morphology of molds', *Biotechnology and Bioengineering*, 23 (1), 149-62.
- Metz, B and Kossen, NWF (1977), 'The growth of molds in the form of pellets—a literature review', *Biotechnology and Bioengineering*, 19 (6), 781-99.
- Mizu, M., et al. (2004), 'Protection of polynucleotides against nuclease-mediated hydrolysis by complexation with schizophyllan', *Biomaterials*, 25 (15), 3109-16.
- Muralidhar, R. V., et al. (2001), 'A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources', *Biochemical Engineering Journal*, 9 (1), 17-23.
- Narayanan, Kannan Badri and Sakthivel, Natarajan (2011), 'Facile green synthesis of gold nanostructures by NADPH-dependent enzyme from the extract of *Sclerotium rolfsii*', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 380 (1), 156-61.

- Nielsen, J. (1996), 'Modelling the morphology of filamentous microorganisms', *Trends in Biotechnology*, 14 (11), 438-43.
- Nielsen, J., et al. (1995), 'Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production', *Biotechnology progress*, 11 (1), 93-98.
- Noïk, C. and Lecourtier, J. (1993), 'Studies on scleroglucan conformation by rheological measurements versus temperature up to 150°C', *Polymer*, 34 (1), 150-57.
- Norisuye, T., Yanaki, T., and Fujita, H. (1980), 'Triple helix of a *Schizophyllum commune* polysaccharide in aqueous solution', *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 18 (3), 547-58.
- O'Clairigh, C., et al. (2005), 'Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (3), 305-10.
- Packer, H. L. and Thomas, C. R. (1990), 'Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis', *Biotechnology and Bioengineering*, 35 (9), 870-81.
- Papagianni, M. (2004), 'Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes', *Biotechnology Advances*, 22 (3), 189-259.
- (2006), 'Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *Aspergillus niger* submerged cultures', *Microbial Cell Factories*, 5.
- (2007), 'Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling', *Biotechnology advances*, 25 (3), 244-63.
- Papagianni, M. and Moo-Young, M. (2002), 'Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects', *Process Biochemistry*, 37 (11), 1271-78.
- Papagianni, M. and Matthey, M. (2006), 'Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology', *Microbial Cell Factories*, 5.
- Papagianni, M., Nokes, S. E., and Filer, K. (1999), 'Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation', *Process Biochemistry*, 35 (3), 397-402.
- Park, E. Y., et al. (2002a), 'Monitoring of morphological development of the arachidonic-acid-producing filamentous microorganism *Mortierella alpina*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (6), 706-12.
- Park, J. P., et al. (2002b), 'Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*', *Process Biochemistry*, 37 (11), 1257-62.
- (2002c), 'Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*', *Letters in Applied Microbiology*, 34 (6), 433-38.
- Paul, Priede, MA, and Thomas, CR (1999), 'Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations', *Biochemical Engineering Journal*, 3 (2), 121-29.
- Paul, G. C. and Thomas, C. R. (1998), 'Characterisation of mycelial morphology using image analysis', *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 60, 1-59.
- Paul, Gr C, Kent, CA, and Thomas, CR (1994), 'Hyphal vacuolation and fragmentation in *penicillium chrysogenum*', *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (5), 655-60.

- Pearson, Karl (1901), 'LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space', *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2 (11), 559-72.
- Plackett, R. L. and Burman, J. P. (1946), 'The Design of Optimum Multifactorial Experiments', *Biometrika*, 33 (4), 305-25.
- Polizeli, MLTM, et al. (2005), 'Xylanases from fungi: properties and industrial applications', *Applied microbiology and biotechnology*, 67 (5), 577-91.
- Posch, A. E., Spadiut, O., and Herwig, C. (2012), 'A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi', *Fungal Genetics and Biology*, 49 (7), 499-510.
- Posch, A. E., Herwig, C., and Spadiut, O. (2013), 'Science-based bioprocess design for filamentous fungi', *Trends in Biotechnology*, 31 (1), 37-44.
- Posch, A. E., et al. (2013b), 'Combining light microscopy, dielectric spectroscopy, MALDI intact cell mass spectrometry, FTIR spectromicroscopy and multivariate data mining for morphological and physiological bioprocess characterization of filamentous organisms', *Fungal Genetics and Biology*, 51 (1), 1-11.
- Pretus, H. A., et al. (1991), 'Isolation, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of soluble scleroglucan', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257 (1), 500-10.
- Pringle, Alastair T, Forsdyke, J, and Rose, AH (1979), 'Scanning electron microscope study of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplast formation', *Journal of bacteriology*, 140 (1), 289-93.
- Prokop, A., Rapp, P., and Wagner, F. (1992), 'Production of extracellular  $\beta$ -1,3-/ $\beta$ -1,6-glucan by mono- and dikaryons of *Schizophyllum commune*', *Experimental Mycology*, 16 (3), 197-206.
- Rajendran, A., Thirugnanam, M., and Thangavelu, V. (2007), 'Statistical evaluation of medium components by Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by *Pseudomonas fluorescens*', *Indian Journal of Biotechnology*, 6 (4), 469-78.
- Rau, U. and Brandt, C. (1994), 'Oxygen controlled batch cultivations of *Schizophyllum commune* for enhanced production of branched  $\beta$ -1,3-glucans', *Bioprocess Engineering*, 11 (4), 161-65.
- Rau, U., et al. (1990), 'Process and molecular data of branched 1,3- $\beta$ -D-glucans in comparison with Xanthan', *Bioprocess Engineering*, 5 (2), 89-93.
- Rau, U., et al. (1992), 'Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing', *Journal of Industrial Microbiology*, 9 (1), 19-25.
- Rinaudo, M. and Vincendon, M. (1982), '<sup>13</sup>C NMR structural investigation of scleroglucan', *Carbohydrate Polymers*, 2 (2), 135-44.
- Ryoo, D. and Choi, C.-S. (1999), 'Surface thermodynamics of pellet formation in *Aspergillus niger*', *Biotechnology letters*, 21 (2), 97-100.
- Schirmer, C., et al. (2019), 'How to Produce mAbs in a Cube-Shaped Stirred Single-Use Bioreactor at 200 L Scale', *Animal Cell Biotechnology*, 2095, 169-86.
- Scholtmeijer, K., et al. (2009), 'Assembly of the fungal SC3 hydrophobin into functional amyloid fibrils depends on its concentration and is promoted by cell wall polysaccharides', *Journal of Biological Chemistry*, 284 (39), 26309-14.
- Schügerl, K., Gerlach, S. R., and Siedenberg, D. (1998), 'Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergilli*', *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 60, 195-266.



- Sietsma, J. H. and Wessels, J. G. H. (1979), 'Evidence for covalent linkages between chitin and  $\beta$ -glucan in a fungal wall', *Journal of General Microbiology*, 114 (1), 99-108.
- Sinha, J., et al. (2001a), 'Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor', *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (6-7), 392-99.
- Sinha, J., et al. (2001b), 'Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (1-2), 88-92.
- Sletmoen, M. and Stokke, B. T. (2008), 'Review: Higher order structure of (1,3)- $\beta$ -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities', *Biopolymers*, 89 (4), 310-21.
- Slomczynski, D, Nakas, JPK, and Tanenbaum, SW (1995), 'Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34', *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3), 907-12.
- Spohr, A., et al. (1998), 'On-line study of fungal morphology during submerged growth in a small flow-through cell', *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (5), 541-53.
- Sunde, M., et al. (2008), 'Structural analysis of hydrophobins', *Micron*, 39 (7), 773-84.
- Tabata, K., et al. (1981), 'Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* fries', *Carbohydrate Research*, 89 (1), 121-35.
- Tao, T-L., et al. (2018), 'Improved mycelia and polysaccharide production of *Grifola frondosa* by controlling morphology with microparticle Talc', *Microbial Cell Factories*, 17 (1), 10.
- Treskatis, S. K., et al. (1997), 'Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition', *Biotechnology and Bioengineering*, 53 (2), 191-201.
- Trinci, APJ (1970), 'Kinetics of the growth of mycelial pellets of *Aspergillus nidulans*', *Archives of Microbiology*, 73 (4), 353-67.
- Trinci, APJ (1974), 'A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia', *Microbiology*, 81 (1), 225-36.
- Vaidyanathan, S., et al. (2001), 'Assessment of the structure and predictive ability of models developed for monitoring key analytes in a submerged fungal bioprocess using near-infrared spectroscopy', *Applied Spectroscopy*, 55 (4), 444-53.
- Vaidyanathan, S., et al. (2003), 'Influence of morphology on the near-infrared spectra of mycelial biomass and its implications in bioprocess monitoring', *Biotechnology and Bioengineering*, 82 (6), 715-24.
- van Suijdam, J. C., Kossen, N. W. F., and Paul, P. G. (1980), 'An inoculum technique for the production of fungal pellets', *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10 (3), 211-21.
- Vecht-Lifshitz, S.E., Magdassi, S., and Braun, S. (1990), 'Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*', *Biotechnology and Bioengineering*, 35 (9), 890-96.
- Veiter, L. and Herwig, C. (2019), 'The filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* analysed via flow cytometry - a fast and statistically sound insight into morphology and viability', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 6725-35.
- Veiter, L., Rajamanickam, V., and Herwig, C. (2018), 'The filamentous fungal pellet - relationship between morphology and productivity', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (7), 2997-3006.

- Veuskens, J., Rau, U., and Wagner, F. (1990), 'Continuous production of exocellular polysaccharides by *Schizophyllum commune*', *Dechema Biotechnol.Conf.*, 4 (Part B), 725-28.
- Vidal-Diez de Ulzurrun, G., et al. (2019), 'Fungal feature tracker (FFT): A tool for quantitatively characterizing the morphology and growth of filamentous fungi', *Computational Biology*.
- Viñarta, S. C., et al. (2007), 'Sclerotium rolfsii scleroglucan: The promising behavior of a natural polysaccharide as a drug delivery vehicle, suspension stabilizer and emulsifier', *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (3), 314-23.
- von Goethe, Johann Wolfgang (1817), *Zur Morphologie* (1: Verlag der J.G. Gotta'schen Buchhandlung).
- Wagner, R., et al. (2004), 'Links between morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide', *Journal of Biotechnology*, 114 (1-2), 153-64.
- Walisko, R., et al. (2012), 'Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production', *Biotechnology Letters*, 34 (11), 1975-82.
- Walisko, R., et al. (2015), 'The Taming of the Shrew - Controlling the Morphology of Filamentous Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms', *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 149, 1-27.
- Wang, Y. X. and Lu, Z. X. (2005), 'Optimization of processing parameters for the mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Boletus* spp. ACCC 50328', *Process Biochemistry*, 40 (3-4), 1043-51.
- Wargenau, A., et al. (2011), 'On the origin of the electrostatic surface potential of *Aspergillus niger* spores in acidic environments.', *Research in Microbiology*, 162, 1011-17.
- Wendland, Jürgen (2001), 'Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast', *Fungal Genetics and Biology*, 34 (2), 63-82.
- Wessels, J. G. H. (1997), 'Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface', (38), 35-45.
- Wessels, J. G. H., Sietsma, J. H., and Sonnenberg, A. S. M. (1983), 'Wall synthesis and assembly during hyphal morphogenesis in *Schizophyllum commune*', *Journal of General Microbiology*, 129 (6), 1607-16.
- Weuster-Botz, D. (2000), 'Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search?', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (5), 473-83.
- Wiebe, Marilyn G, et al. (1996), 'How do highly branched (colonial) mutants of *Fusarium graminearum* A3/5 arise during Quorn® myco-protein fermentations?', *Microbiology*, 142 (3), 525-32.
- Willke, Th and Vorlop, K-D (2001), 'Biotechnological production of itaconic acid', *Applied microbiology and biotechnology*, 56 (3-4), 289-95.
- Wold, S., Kettaneh, N., Friden, H., Holmberg, A., et. al. (1998), 'Modelling and diagnostics of batch processes and analogous kinetic experiments', *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 44, 335-44.
- Wösten, H. A. B. and Scholtmeijer, K. (2015), 'Applications of hydrophobins: current state and perspectives', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (4), 1587-97.
- Wucherpfennig, T., Hestler, T., and Krull, R. (2011), 'Morphology engineering - Osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity', *Microbial Cell Factories*, 10.

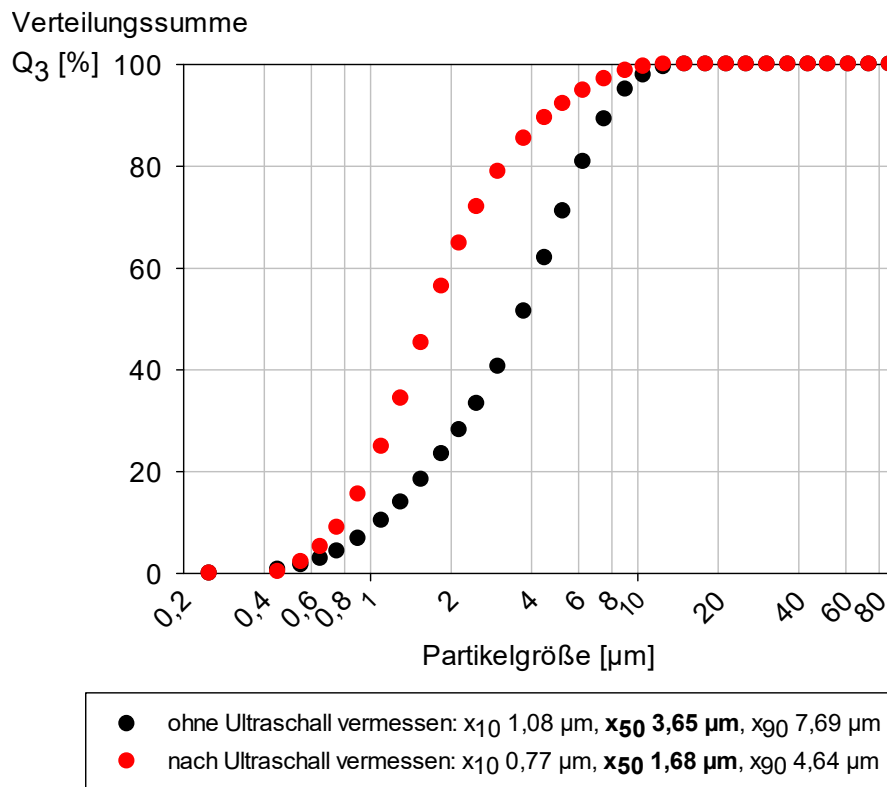
- Wucherpennig, T., et al. (2010), 'Morphology and Rheology in Filamentous Cultivations', (72), 89-136.
- Wucherpennig, T., et al. (2012), 'Customization of *Aspergillus niger* Morphology Through Addition of Talc Micro Particles', *J Vis Exp*, (61), e4023.
- Yanaki, T. and Norisuye, T. (1983), 'TRIPLE HELIX AND RANDOM COIL OF SCLEROGLUCAN IN DILUTE SOLUTION', *Polymer Journal*, 15 (5), 389-96.
- Yanaki, T., Ito, W., and Tabata, K. (1983), 'Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution', *Biophysical Chemistry*, 17 (4), 337-42.
- Yanaki, T., Tabata, K., and Kojima, T. (1985), 'Melting behaviour of a triple helical polysaccharide schizophyllan in aqueous solution', *Carbohydrate Polymers*, 5 (4), 275-83.
- Zhang, J. and Zhang, J. (2015), 'The filamentous fungal pellet and forces driving its formation', *Critical Reviews in Biotechnology*.
- Zhang, Y., et al. (2013), 'Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments', *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1 (1), 53-71.
- Žnidaršič, P., Komel, R., and Pavko, A. (2000), 'Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (7), 589-93.

#### **IV Abkürzungsverzeichnis**

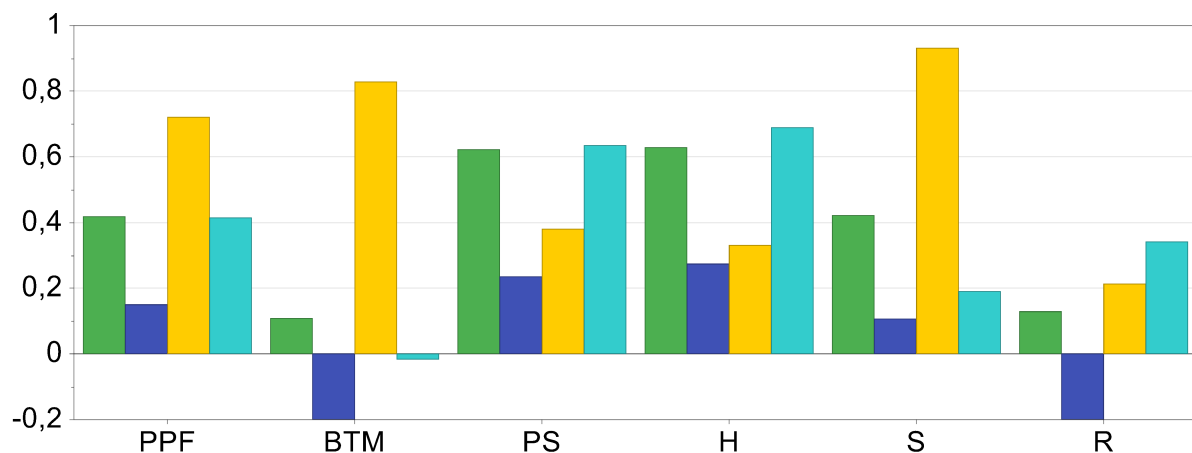
ANOVA	Analysis of variance
BTM	Biotrockenmassekonzentration
CCC	Central Composite Circumscribed (Versuchsplan)
CCF	Central Composite Face-centered (Versuchsplan)
D	Drehzahl (bei Homogenisierung von Pilzmycel)
d	Pelletdicke
DoE	design of experiments / statistische Versuchsplanung
DNS	Dinitrosalicylsäure
FF	Voll-faktorieller Versuchsplan
G	Grauwert
H	Homogenität
HK	Hauptkultur
I	Inokulummenge
IK	Inokulumkonzentration
M	Modellvalidität
MLR	multiple lineare Regression
n	Drehzahl (bei Homogenisierung von Pilzmycel)
NIR	Nah-Infrarot
OD	optische Dichte
P	Pellet
P1 und P2	Hauptkomponenten einer Hauptkomponentenanalyse
PA	Pelletanzahl
PCA	principal component analysis
PK	Pelletkonzentration
PK <sub>G</sub>	gemessene Pelletkonzentration
PK <sub>M</sub>	Pelletkonzentration berechnet in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter

PPF	projizierte Pelletfläche
PPF <sub>G</sub>	gemessene projizierte Pelletfläche
PPF <sub>M</sub>	projizierte Pelletfläche berechnet in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter
PS	Polysaccharidkonzentration
R	Rundheit
Rep	Reproduzierbarkeit
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
S	Rauheit
SCH	Schizophyllan
t	Homogenisierungsdauer (bei Homogenisierung von Pilzmycel)
THE	technischer Hefeextrakt
U <sub>P</sub>	Pelletumfang
V <sub>P</sub>	Pelletvolumen
VK	Vorkultur
Y <sub>P/X G</sub>	experimentell bestimmter spezifischer Ertrag bei bestimmten Einstellungen der Homogenisierungsparameter
Y <sub>P/X M</sub>	spezifischer Ertrag berechnet in Abhängigkeit der Homogenisierungsparameter
Y <sub>P/X BG</sub>	spezifischer Ertrag berechnet aus gemessenen Werten PPF <sub>G</sub> und
Y <sub>P/X BM</sub>	berechneter spezifischer Ertrag berechnet mittels PPF <sub>M</sub> und PK <sub>M</sub>

## V Anhang

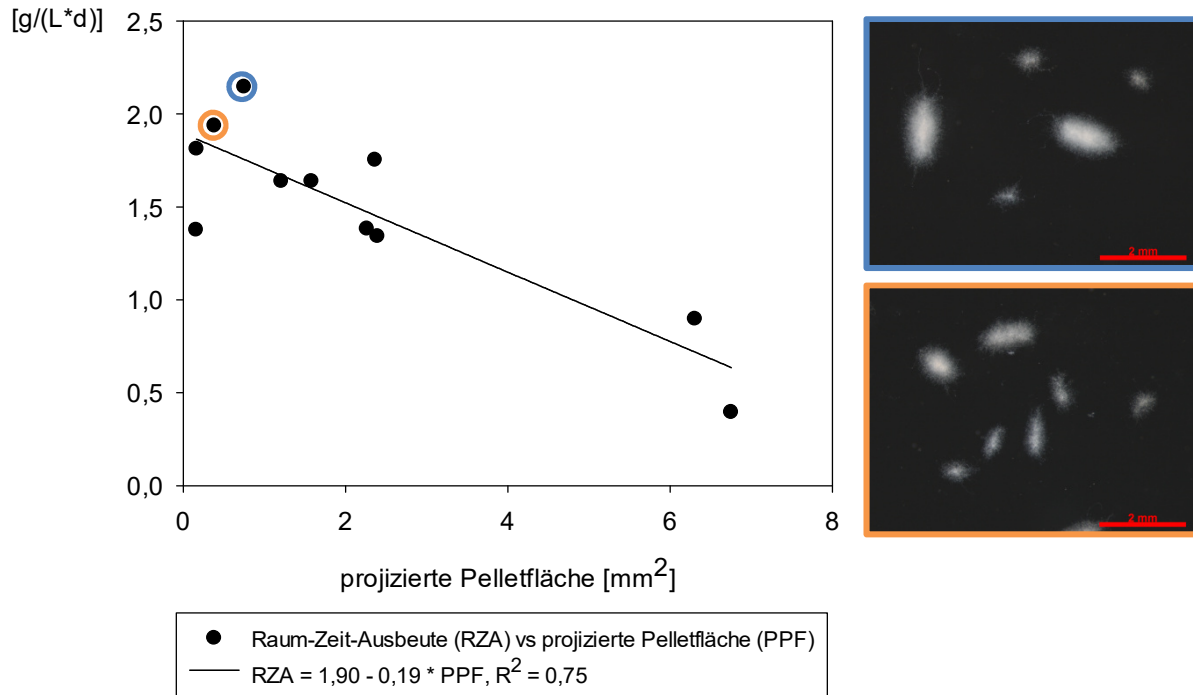


**Abb. A.1:** Massenverteilungssumme für Talkmikropartikel ohne bzw. mit Ultraschallanwendung direkt vor der Messung. Beschreibung der Gewinnung dieser Partikel siehe Kap. 2.2.1.

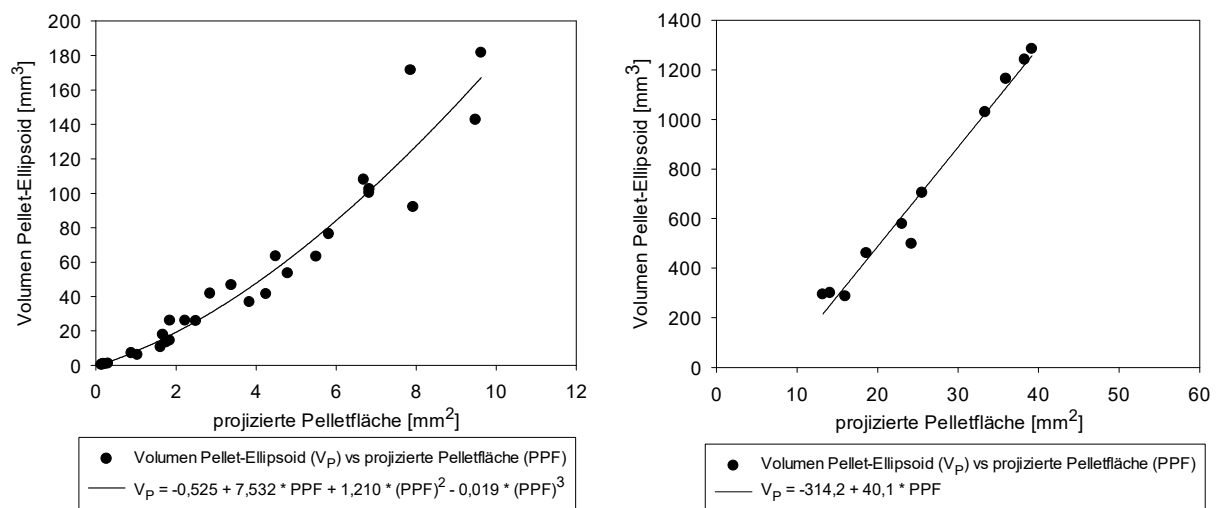


**Abb. A.2:** Statistische Größen zur Bewertung der Modellregression (bzgl. Homogenisierungsparametern für die Homogenisierung von Kultursuspension mit verschiedenen Morphologieparametern von *S. commune* in sich anschließender Kultivierung (zweite Vorkultur), das Beimpfen erfolgte mit konstantem Volumen der homogenisierten Kultursuspension). Modelle mittels multipler linearer Regression gemäß CCC-Versuchsplan in Tabelle 2.10 und 2.11 ermittelt. Je Zielparameter sind von links nach rechts folgende statistische Größen aufgetragen: R<sup>2</sup> (Korrelationskoeffizient für die Variation der Messwerte), Q<sup>2</sup> (Vorhersagegüte), Modellvalidität und Reproduzierbarkeit für die mittels MLR ermittelten Modelle. Zielgrößen: PPF (projizierte Pelletfläche), PK (Pelletkonzentration), BTM (Biotrockenmassekonzentration), RZA (Raum-Zeit-Ausbeute Polysaccharid), H (Homogenität), S (Rauheit).

### Raum-Zeit-Ausbeute



**Abb. A.3:** Raum-Zeit-Ausbeute in Abhängigkeit der projizierten Pelletfläche von *S. commune*. Für die eingekreisten Werte sind mikroskopische Aufnahmen der entsprechenden Proben dargestellt, welche die Morphologie des Pilzes bei der maximalen Raum-Zeit-Ausbeute verdeutlichen.



**Abb. A.4:** Volumen einzelner Pellets (V<sub>P</sub>) in Abhängigkeit deren projizierter Pelletfläche (PPF). Links: Abhängigkeit im Bereich einer projizierten Pelletfläche bis 10 mm<sup>2</sup>. Rechts: Abhängigkeit für Pellets mit projizierter Pelletfläche größer als 10 mm<sup>2</sup>.

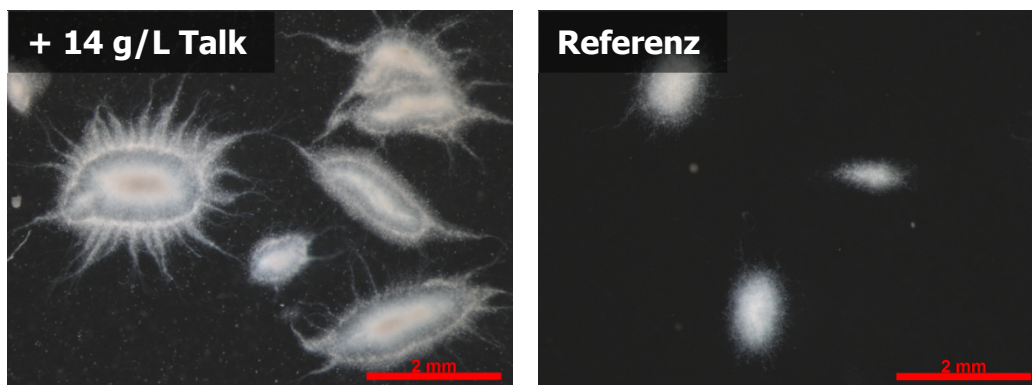
**Tab. A.1:** Für eine Hauptkomponentenanalyse zur Darstellung des *Loading-Plots* in Abbildung 3.26 eingesetzte Werte. Es wurden Werte aus folgenden Versuchen verwendet: Variation der eingesetzten Luftmycelkonzentration ( $\text{cm}^2/\text{L}$ ) in erster Vorkultur (1. VK) sowie Variation der Inokulumkonzentration (Start-Konzentration der Biotrockenmasse in  $\text{g/L}$ ) von homogenisierter Kultursuspension in zweiter Vorkultur (2. VK). Variation der Homogenisierung des Inokulums zum Beimpfen von Schüttelkulturen (CCC-Versuchsplan) und zum Beimpfen von Kultivierungen im Reaktormaßstab (FF-Versuchsplan).

Probe	projizierte Pelletfläche	pelletvolumen- spezifische Biotrockenmasse	pelletvolumen- spezifisch gebildetes Polysaccharid
	$[\text{mm}^2]$	$[\mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mm}_\text{P}^3]$	$[\Delta\mu\text{g}_{\text{PS}}/\text{mm}_\text{P}^3]$
1. VK, 1,96 $\text{cm}^2/\text{L}$	8,01	0,47	0,66
1. VK, 3,93 $\text{cm}^2/\text{L}$	5,37	1,37	0,50
1. VK, 4,96 $\text{cm}^2/\text{L}$	3,64	1,02	0,21
1. VK, 7,85 $\text{cm}^2/\text{L}$	5,78	0,64	0,75
1. VK, 13,27 $\text{cm}^2/\text{L}$	4,52	0,73	0,54
1. VK, 20,11 $\text{cm}^2/\text{L}$	3,10	0,50	0,43
1. VK, 26,55 $\text{cm}^2/\text{L}$	1,53	0,50	0,51
1. VK, 38,86 $\text{cm}^2/\text{L}$	0,36	1,91	1,50
1. VK, 40,21 $\text{cm}^2/\text{L}$	1,57	0,89	0,55
1. VK, 51,18 $\text{cm}^2/\text{L}$	0,93	0,84	0,59
1. VK, 77,72 $\text{cm}^2/\text{L}$	0,34	1,55	1,03
1. VK, 102,35 $\text{cm}^2/\text{L}$	0,39	1,64	1,00
1. VK, 128,90 $\text{cm}^2/\text{L}$	1,75	1,09	1,50
2. VK, 0,02 $\text{g/L}$	6,31	0,47	0,30
2. VK, 0,06 $\text{g/L}$	3,15	0,34	0,53
2. VK, 0,06 $\text{g/L}$	2,90	0,48	0,61
2. VK, 0,10 $\text{g/L}$	2,40	1,05	0,55
2. VK, 0,15 $\text{g/L}$	2,27	0,80	0,41
2. VK, 0,25 $\text{g/L}$	1,21	0,60	0,43
2. VK, 0,50 $\text{g/L}$	0,38	0,63	0,86
2. VK, 0,75 $\text{g/L}$	0,17	0,30	0,61
2. VK, 1,00 $\text{g/L}$	0,16	0,12	0,30
CCC-Versuchspl. N1	2,03	0,54	0,28
CCC-Versuchspl. N3	1,37	0,31	0,21
CCC-Versuchspl. N5	1,10	0,34	0,37
CCC-Versuchspl. N7	1,26	0,54	0,32
FF-Versuchspl. N2	0,50	0,94	1,06
FF-Versuchspl. N3	0,46	0,22	0,50
FF-Versuchspl. N5	0,58	0,27	0,49

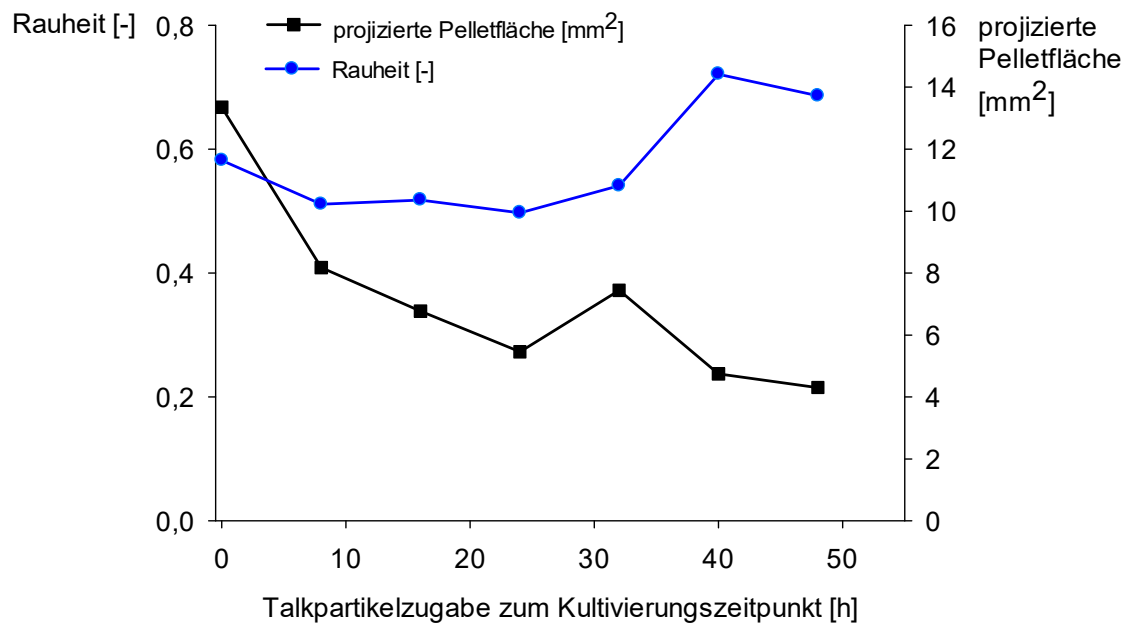


**Tab. A.2:** Biotrockenmassekonzentration und Polysaccharidkonzentration bei Kultivierung mit Talk verschiedener Partikelgröße ( $x_{50}$ : Median des Partikeldurchmessers) im Vergleich zu einer Referenz ohne Partikel. (Zusatz zu Abbildung 3.31; Kap. 3.2.3.1.1).

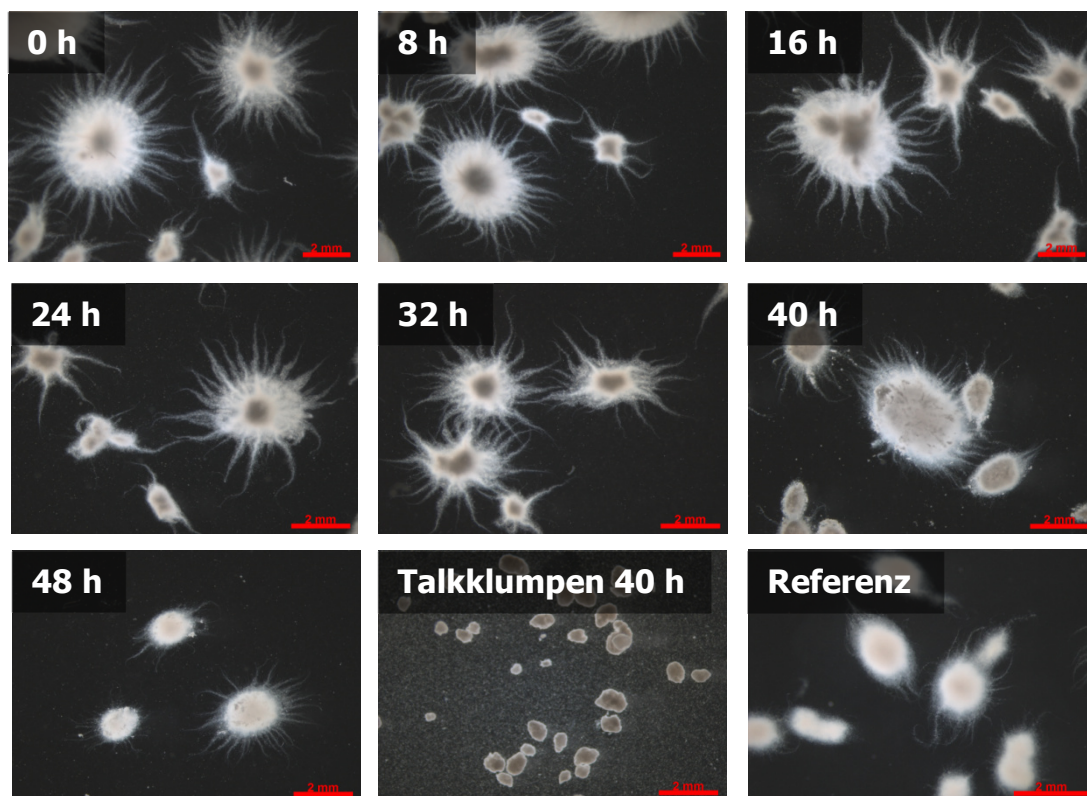
Partikeldurchmesser ( $x_{50}$ )	Biotrockenmasse- konzentration [g/L]	Polysaccharid- konzentration [g/L]
ohne Partikel	$2,90 \pm 0,03$	$2,47 \pm 0,56$
3,65 $\mu\text{m}$	$0,29 \pm 0,13$	$2,77 \pm 0,09$
6,03 $\mu\text{m}$	$1,88 \pm 0,62$	$4,71 \pm 0,51$
15,01 $\mu\text{m}$	$4,60 \pm 1,53$	$3,39 \pm 0,65$



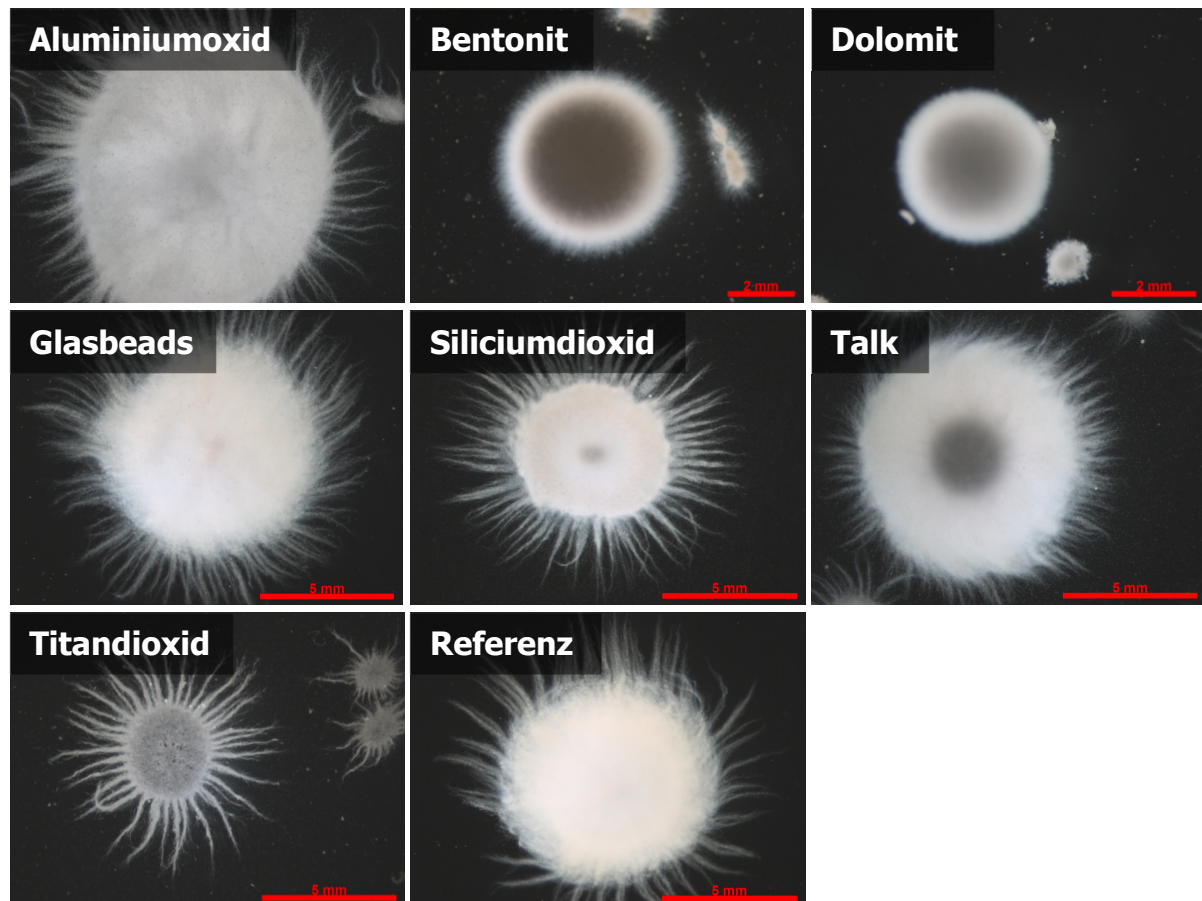
**Abb. A.5:** Mikroskopische Aufnahmen von *S. commune* nach jeweils dreitägiger Kultivierung in zweiter Vorkultur bei Zugabe von Talkpartikeln (14 g/L,  $x_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ ) zu Kultivierungsbeginn sowie bei Kultivierung ohne Mikropartikel (Referenz). Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 mm.



**Abb. A.6:** Projizierte Pelletfläche und Rauheit der Pellets von *S. commune* nach jeweils dreitägiger Kultivierung (erste Vorkultur) in Abhängigkeit der Zugabe von Talkpartikeln (14 g/L,  $x_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung.

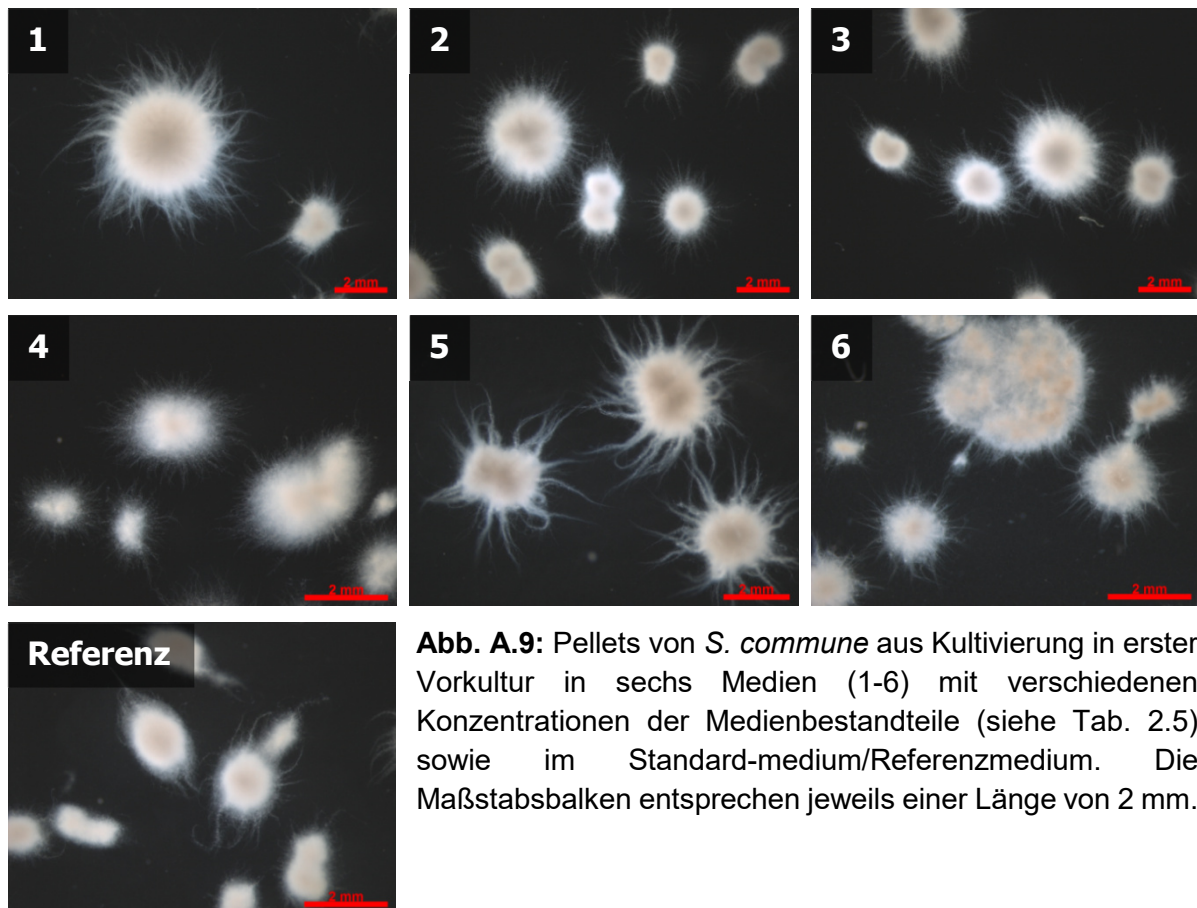


**Abb. A.7:** Mikroskopische Aufnahmen von *S. commune* nach jeweils dreitägiger Kultivierung (erste Vorkultur) in Abhängigkeit der Zugabe von Talkpartikeln (14 g/L,  $x_{50} = 6,03 \mu\text{m}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung sowie einer Kultivierung ohne Mikropartikel (Referenz). Die Aufnahme in der Mitte der unteren Reihe zeigt keine Pellets von *S. commune*, sondern Talkklumpen. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 mm.

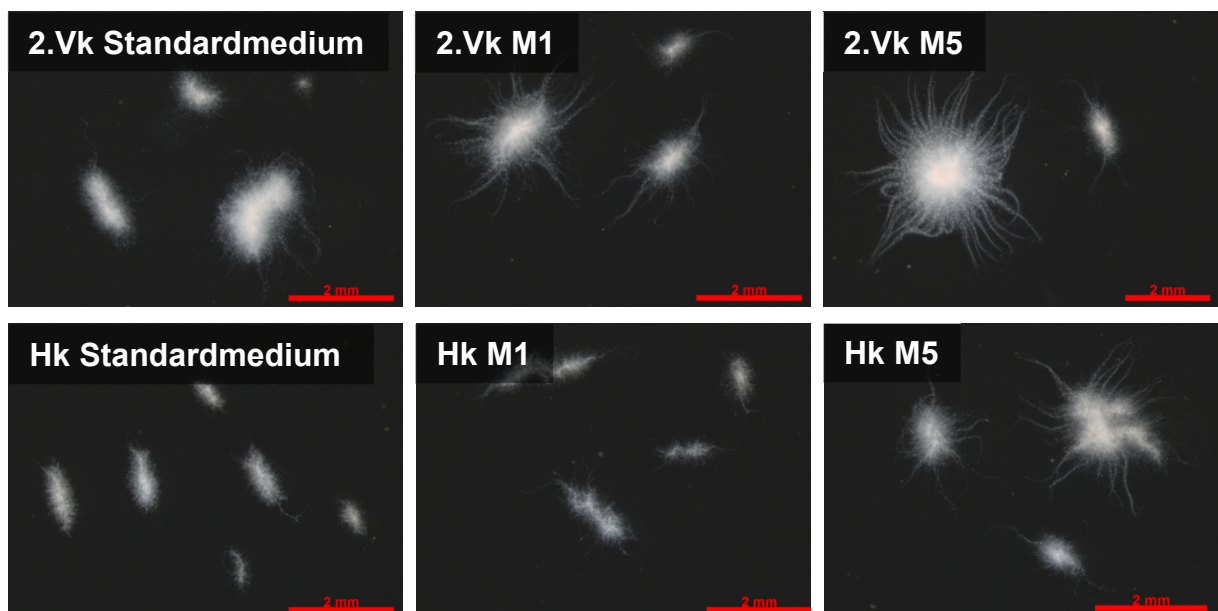


**Abb. A.8:** Pellets von *S. rolfsii* nach batch-Kultivierung mit jeweils 10 g/L Mikropartikeln in Schüttelkolben (500 mL) für 72h im Vergleich mit einem Pellet einer Referenzkultivierung ohne Partikel.





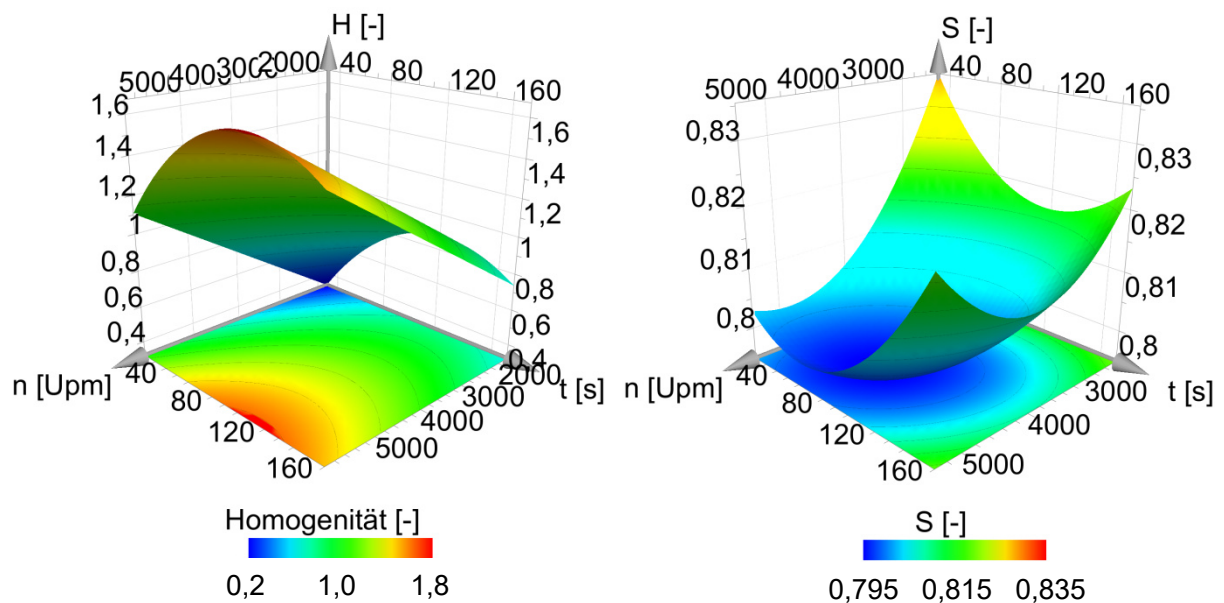
**Abb. A.9:** Pellets von *S. commune* aus Kultivierung in erster Vorkultur in sechs Medien (1-6) mit verschiedenen Konzentrationen der Medienbestandteile (siehe Tab. 2.5) sowie im Standard-medium/Referenzmedium. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 mm.



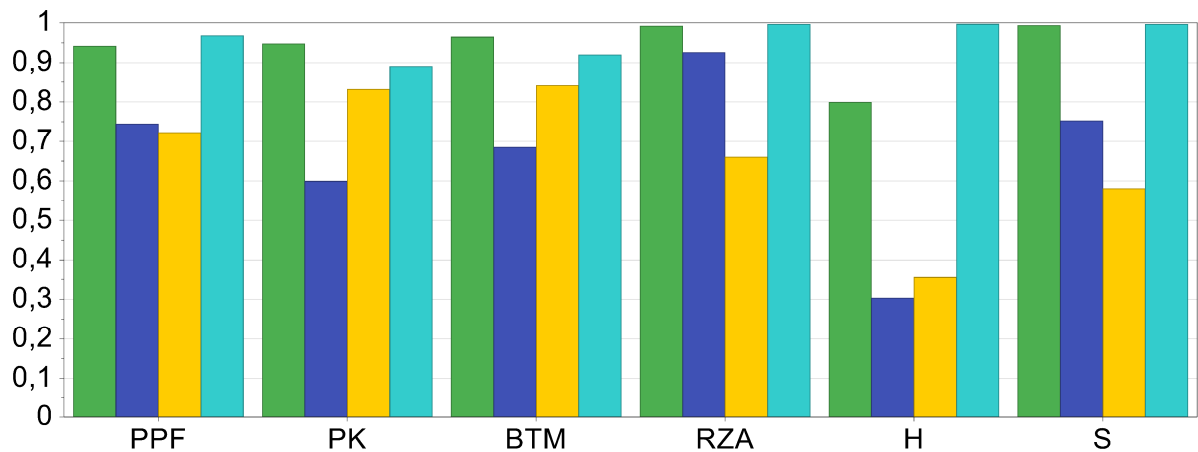
**Abb. A.10:** Pellets von *S. commune* aus Kultivierung in Standardmedium sowie Kultivierung in Medium 1 (M1) und Medium 5 (M5). Medienzusammensetzung siehe Tabelle 2.5. Kultivierung in zweiter Vorkultur (2. Vk) sowie anschließender Kultivierung in der Hauptkultur (Hk). Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 mm.

**Tab. A.3:** Pelletkonzentration (PK), biomassespezifischer Ertrag ( $Y_{P/X}$ ), pelletvolumen-spezifisch gebildetes Polysaccharid (PS) sowie pelletvolumen-spezifische Biomasse (BTM) in Kultivierung von *Schizophyllum commune* in zweiter Vorkultur und Hauptkultur in verschiedenen Medien (siehe Tab. 2.5).

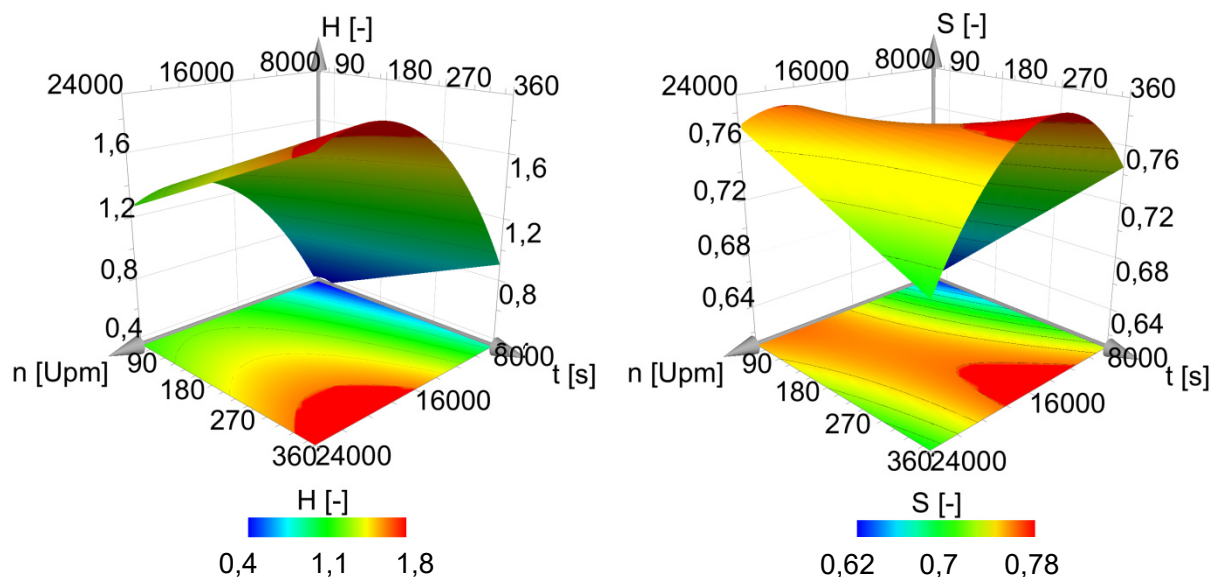
		PK	$Y_{P/X}$	pelletvol.sp. gebildetes PS	pelletvol.sp. BTM
		[1/mL]	[g <sub>PS</sub> /g <sub>BTM</sub> ]	[Δμg <sub>PS</sub> /mm <sub>P</sub> <sup>3</sup> ]	[μg <sub>BTM</sub> /mm <sub>P</sub> <sup>3</sup> ]
Zweite Vorkultur	Standardmedium	2052 ± 161	1,06 ± 0,08	0,48 ± 0,00	0,48 ± 0,00
	Medium M1	2424 ± 57	2,78 ± 0,30	0,33 ± 0,00	0,14 ± 0,00
	Medium M5	701 ± 21	2,57 ± 0,15	0,43 ± 0,00	0,19 ± 0,00
Haupt- kultur	Standardmedium	3771 ± 47	0,93 ± 0,07	0,21 ± 0,00	0,24 ± 0,00
	Medium M1	3440 ± 113	0,97 ± 0,13	0,23 ± 0,00	0,25 ± 0,00
	Medium M5	1791 ± 140	1,05 ± 0,20	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00



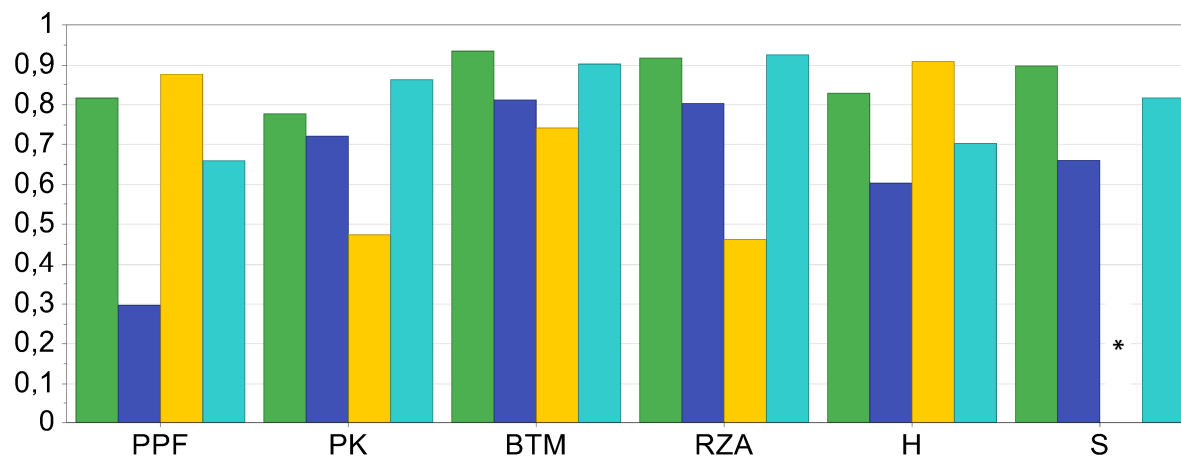
**Abb. A.11:** Homogenität der Pelletgrößenverteilung (H) und Pelletrauheit (S) nach Kultivierung in zweiter Vorkultur für 72 h in Abhängigkeit der Drehzahl n und der Homogenisierungsdauer t bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus erster Vorkultur. Parametereinstellungen siehe CCC-Versuchsplan Tab. 2.10 und 2.11.



**Abb. A.12:** Statistische Größen zur Bewertung der Modellregression (bzgl. Homogenisierungsparametern für die Homogenisierung von Kultursuspension mit verschiedenen Morphologieparametern von *S. commune* in sich anschließender Kultivierung (zweite Vorkultur), das Beimpfen erfolgte mit variablem Volumen der homogenisierten Kultursuspension). Modelle mittels multipler linearer Regression gemäß CCC-Versuchsplan in Tabelle 2.10 und 2.11 ermittelt. Je Zielparemeter sind von links nach rechts folgende statistische Größen aufgetragen:  $R^2$  (Korrelationskoeffizient für die Variation der Messwerte),  $Q^2$  (Vorhersagegüte), Modellvalidität und Reproduzierbarkeit für die mittels MLR ermittelten Modelle. Zielgrößen: PPF (projizierte Pelletfläche), PK (Pelletkonzentration), BTM (Biotrockenmassekonzentration), RZA (Raum-Zeit-Ausbeute Polysaccharid), H (Homogenität), S (Rauheit).



**Abb. A.13:** Homogenität der Pelletgrößenverteilung (H) und Pelletrauheit (S) nach Kultivierung im Bioreaktor (3 L) für 72 h in Abhängigkeit der Drehzahl  $n$  und der Homogenisierungsdauer  $t$  bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums aus zweiter Vorkultur. Parametereinstellungen siehe FF-Versuchsplan Tab. 2.12 und 2.13.

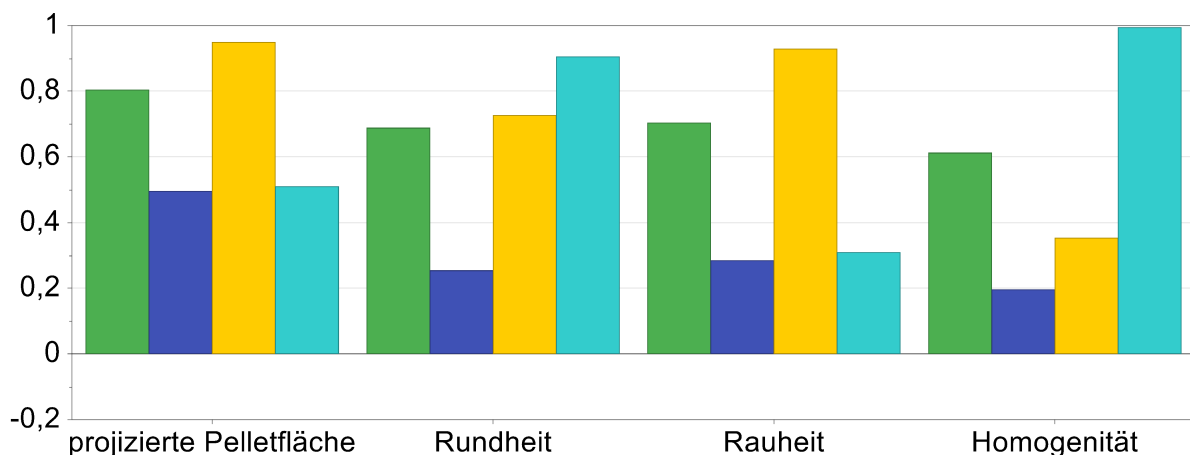


**Abb. A.14:** Statistische Größen zur Bewertung der Modellregression von mittels MLR ermittelten Modellen gemäß FF-Versuchsplan in Tabelle 2.12 und 2.13. Je Zielparameter sind von links nach rechts folgende statistische Größen aufgetragen:  $R^2$  (Korrelationskoeffizient für die Variation der Messwerte),  $Q^2$  (Vorhersagegüte), Modellvalidität und Reproduzierbarkeit für die mittels MLR ermittelten Modelle. Zielgrößen: PPF (projizierte Pelletfläche), PK (Pelletkonzentration), BTM (Biotrockenmassekonzentration), RZA (Raum-Zeit-Ausbeute Polysaccharid), H (Homogenität), S (Rauheit).

\* Modellvalidität aufgrund fehlender Freiheitsgrade nicht ermittelbar.

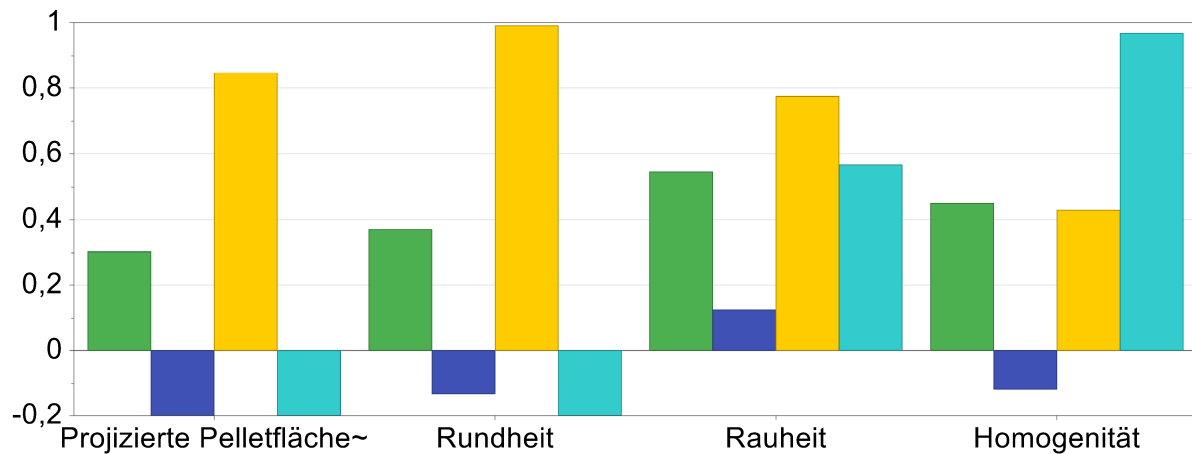
**Tab. A.4:** Folgende Polynome beschreiben die Abhängigkeit verschiedener Zielgrößen (PPF: projizierte Pelletfläche; PK: Pelletkonzentration; BTM: Biotrockenmassekonzentration; RZA: Raum-Zeit-Ausbeute; H: Homogenität; S: Rauheit) von bei Homogenisierung des Inokulums eingestellten Parametern (n: Drehzahl des Dispergierers in Upm; t: Dauer der Homogenisierung in s). Die in Kap. 3.2.4 in Abbildung 3.36, 3.37, 3.38 und 3.39 sowie im Anhang in Abbildungen A.11 und A.13 dargestellten *Response Surface* Graphen werden von den Polynomen beschrieben. Koeffizienten, die bei Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,20 nicht signifikant waren, wurden gelöscht.

Polynom	
Schüttel- kultur	PPF = $6,00 - 1,94 \cdot 10^{-3} \cdot n - 1,29 \cdot 10^{-2} \cdot t + 1,80 \cdot 10^{-7} \cdot n^2 + 2,48 \cdot 10^{-6} \cdot t \cdot n$
	PK = $-742 - 1,43 \cdot 10^{-1} \cdot n + 40,79 \cdot t + 1,17 \cdot 10^{-4} \cdot n^2 - 1,19 \cdot 10^{-1} \cdot t^2 - 3,97 \cdot 10^{-3} \cdot t \cdot n$
	BTM = $9,51 + 7,07 \cdot 10^{-4} \cdot n - 7,29 \cdot 10^{-2} \cdot t - 2,76 \cdot 10^{-7} \cdot n^2 + 1,71 \cdot 10^{-4} \cdot t^2 + 7,45 \cdot 10^{-6} \cdot t \cdot n$
	RZA = $1,37 - 2,46 \cdot 10^{-4} \cdot n + 6,39 \cdot 10^{-3} \cdot t + 5,42 \cdot 10^{-8} \cdot n^2 - 3,67 \cdot 10^{-5} \cdot t^2$
	H = $-0,43 + 1,86 \cdot 10^{-4} \cdot n + 1,60 \cdot 10^{-2} \cdot t - 6,50 \cdot 10^{-5} \cdot t^2$
	S = $0,95 - 5,56 \cdot 10^{-5} \cdot n - 7,50 \cdot 10^{-4} \cdot t + 5,50 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 + 2,45 \cdot 10^{-6} \cdot t^2 + 7,33 \cdot 10^{-8} \cdot t \cdot n$
Reaktor- kultur	PPF = $1,12 - 2,85 \cdot 10^{-5} \cdot n - 1,93 \cdot 10^{-3} \cdot t + 1,081 \cdot 10^{-7} \cdot t \cdot n$
	PK = $680,75 + 1,06 \cdot 10^{-1} \cdot n$
	BTM = $9,97 - 3,26 \cdot 10^{-4} \cdot n - 1,01 \cdot 10^{-2} \cdot t + 3,81 \cdot 10^{-7} \cdot t \cdot n$
	RZA = $1,07 + 3,49 \cdot 10^{-5} \cdot n + 3,36 \cdot 10^{-3} \cdot t - 2,37 \cdot 10^{-7} \cdot t \cdot n$
	H = $-1,57 + 2,75 \cdot 10^{-4} \cdot n + 1,89 \cdot 10^{-3} \cdot t - 6,70 \cdot 10^{-9} \cdot n^2$
	S = $0,29 + 4,54 \cdot 10^{-5} \cdot n + 7,83 \cdot 10^{-4} \cdot t - 1,03 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 - 4,17 \cdot 10^{-8} \cdot t \cdot n$



**Abb. A.15:** Statistische Größen zur Bewertung der Modellregression (bzgl. Homogenisierungsparametern der Homogenisierung von Luftmycel mit verschiedenen Morphologieparametern von *S. rolfsii* in anschließender Submerskultivierung). Modelle mittels multipler linearer Regression auf Grundlage eines CCC-Versuchsplans ermittelt. Je Zielparameter sind von links nach rechts folgende statistische Größen aufgetragen:  $R^2$  (Korrelationskoeffizient für die Variation der Messwerte),  $Q^2$  (Vorhersagegüte), Modellvalidität und Reproduzierbarkeit für die mittels MLR ermittelten Modelle.

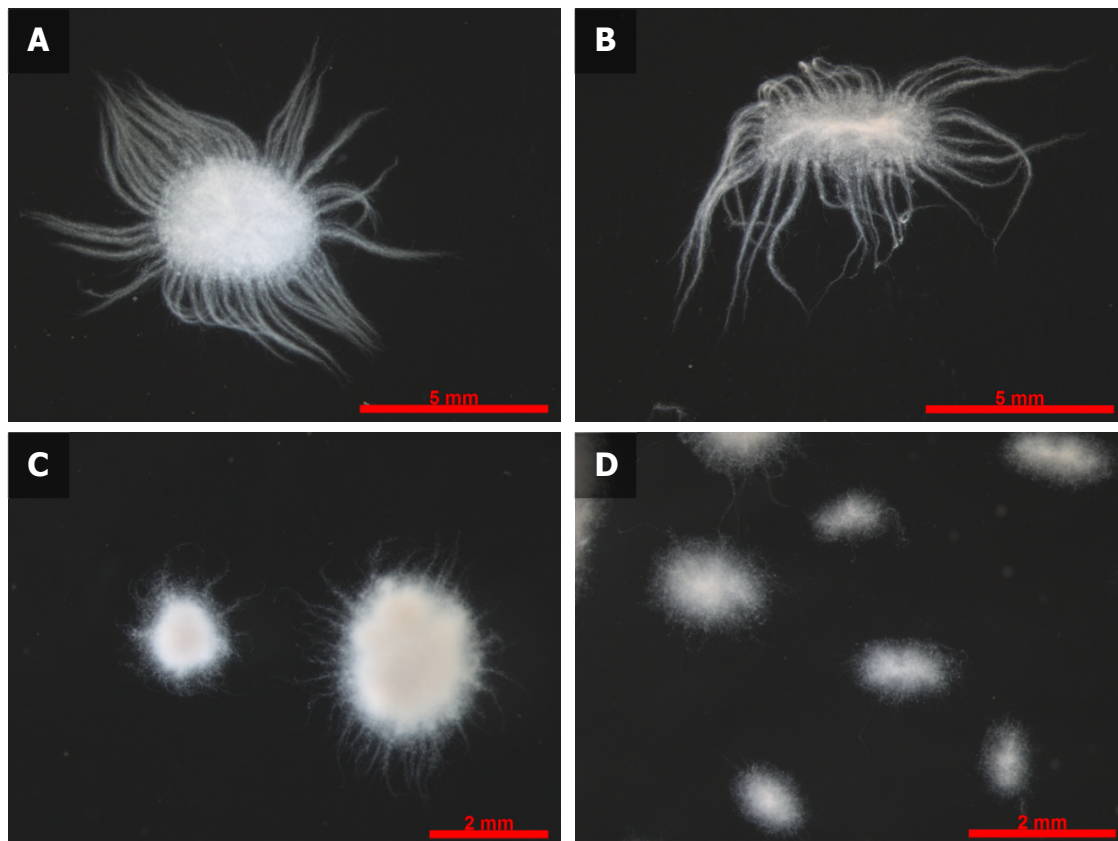




**Abb. A.16:** Statistische Größen zur Bewertung der Modellregression (bzgl. Homogenisierungsparametern für die Homogenisierung von Kultursuspension mit verschiedenen Morphologieparametern von *S. rolfsii* in sich anschließender Kultivierung (zweite Vorkultur)). Modelle mittels multipler linearer Regression auf Grundlage eines CCC-Versuchsplans ermittelt. Je Zielparameter sind von links nach rechts folgende statistische Größen aufgetragen:  $R^2$  (Korrelationskoeffizient für die Variation der Messwerte),  $Q^2$  (Vorhersagegüte), Modellvalidität und Reproduzierbarkeit für die mittels MLR ermittelten Modelle.

**Tab. A.5:** Projizierte Pelletfläche (PPF) und Rauheit (S) von *Sclerotium rolfsii* und *Schizophyllum commune* bei Homogenisierung des verwendeten Inokulums (Kultursuspension aus erster Vorkultur) unter gleichen Bedingungen. Gesamter Kultivierungsprozess bis auf verwendetes Medium identisch.

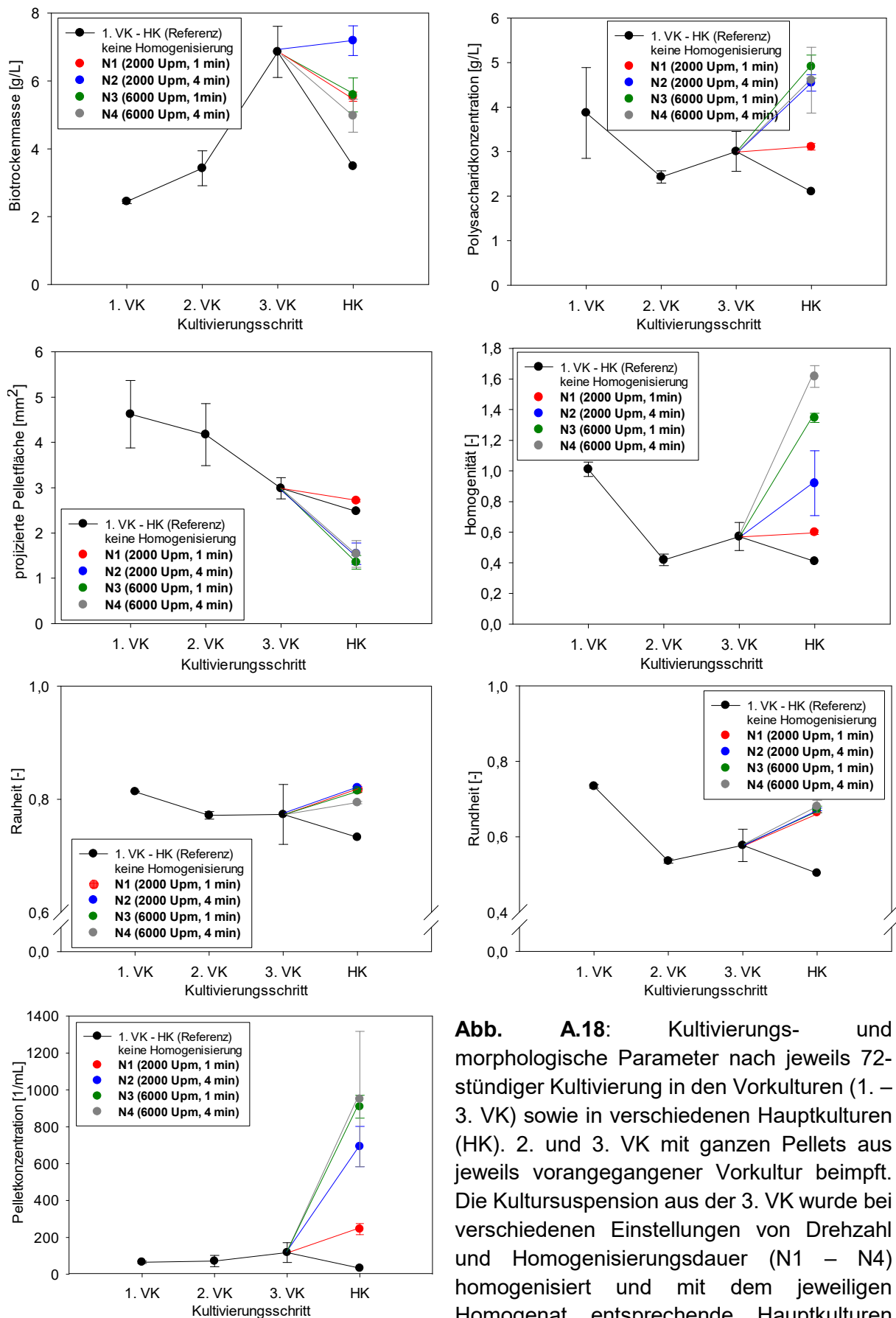
Versuchsbezeichnung gemäß Tabelle 2.11	<i>Sclerotium rolfsii</i>		<i>Schizophyllum commune</i>	
	PPF [mm²]	S [-]	PPF [mm²]	S [-]
N1	3,06	0,36	2,03	0,83
N2	2,61	0,42	0,69	0,80
N3	2,22	0,36	1,37	0,82
N4	1,49	0,39	0,78	0,81
N5	1,79	0,37	1,10	0,80
N6	3,97	0,39	1,11	0,83
N7	4,23	0,38	1,26	0,81
N8	2,38	0,39	0,74	0,81
N9	3,86	0,40	0,81	0,80
N10	2,23	0,42	0,70	0,80



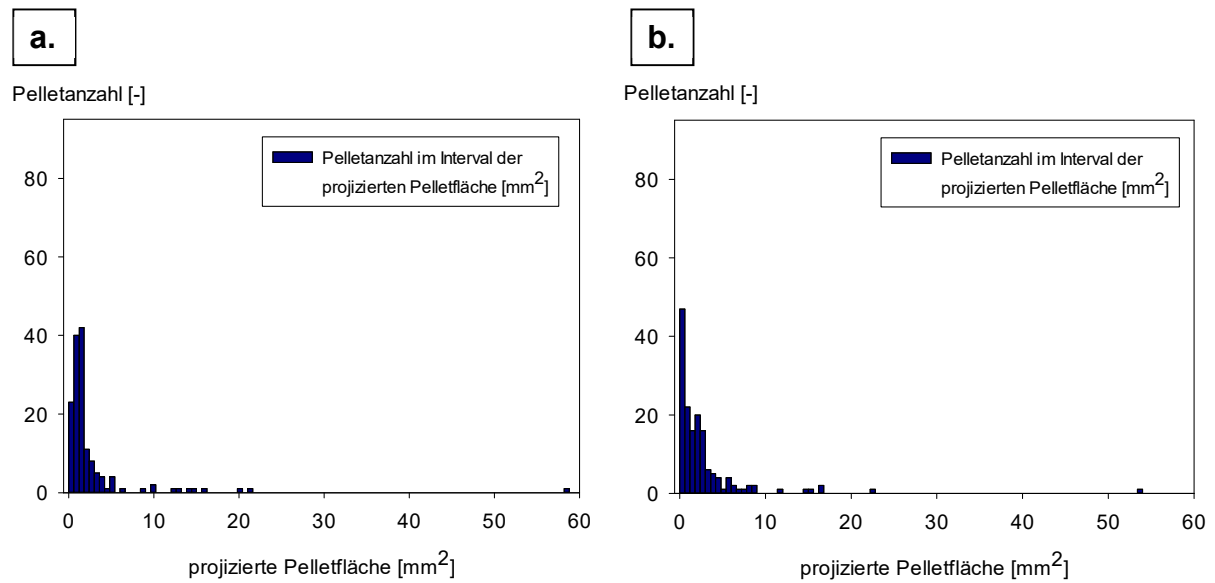
**Abb. A.17:** Mikroskopische Aufnahme von *S. rolfsii* in erster Vorkultur (A) und *S. rolfsii* in zweiter Vorkultur (B). Jeweils darunter mikroskopische Aufnahme *S. commune* in erster Vorkultur (C) und von *S. commune* in zweiter Vorkultur (D). Gesamter Kultivierungsprozess bis auf verwendetes Medium identisch. Homogenisierung der Suspension aus erster Vorkultur bei 2370 Upm für 150 s und als Inokulum zum Beimpfen der zweiten Vorkultur mit 5 % (v/v) eingesetzt.

**Tab. A.6:** Gemessene Polysaccharidkonzentration im Vergleich zu einer mit Hilfe der projizierten Pelletfläche sowie der Pelletkonzentration berechneten Polysaccharidkonzentration (Gleichung 3.6). Durch Multiplikation von  $Y_{P/X}$  mit der errechneten Biotrockenmassekonzentration (mit Hilfe der Morphologie errechnet, Abb. 3.39) wurde die gebildete Polysaccharidmenge nur auf Grundlage morphologischer Parameter errechnet. Angaben und Berechnungen am Beispiel der letzten drei Proben einer Reaktorkultivierung im 3L-Maßstab (Versuch N5, Tab. 2.13, Abb. 3.9). Werte von Proben zu früheren Kultivierungszeitpunkten liegen außerhalb des gültigen Bereichs.

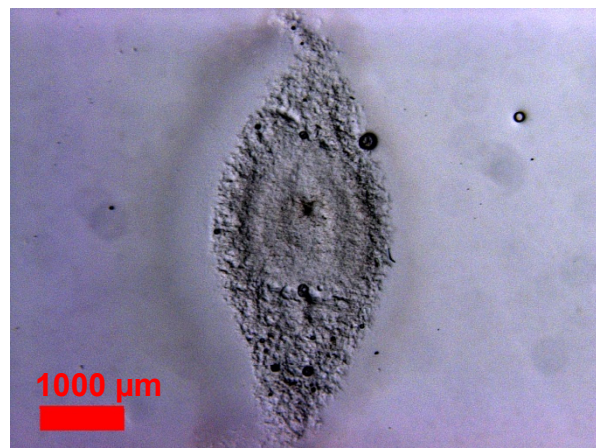
Probe / Kultivierungsdauer [h]	gemessene Polysaccharidkonzentration [g/L]	berechnete Polysaccharidkonzentration [g/L]
5 / 47	$3,24 \pm 0,51$	2,66
6 / 54	$3,64 \pm 0,00$	3,65
7 / 72	$6,57 \pm 0,68$	4,05



**Abb. A.18:** Kultivierungs- und morphologische Parameter nach jeweils 72-stündiger Kultivierung in den Vorkulturen (1. – 3. VK) sowie in verschiedenen Hauptkulturen (HK). 2. und 3. VK mit ganzen Pellets aus jeweils vorangegangener Vorkultur beimpft. Die Kultursuspension aus der 3. VK wurde bei verschiedenen Einstellungen von Drehzahl und Homogenisierungsdauer (N1 – N4) homogenisiert und mit dem jeweiligen Homogenat entsprechende Hauptkulturen beimpft.



**Abb. A.19:** Verteilung der Pelletanzahl von *S. commune* über der projizierten Pelletfläche (Intervallbreite 0,6 mm<sup>2</sup>) in 3. Vorkultur in Schüttelkolben nach 72h Kultivierung. Inokulum vor Beimpfen nicht homogenisiert. a.: Erste Versuchsdurchführung, b.: Zweite Versuchsdurchführung.



**Abb. A.20:** Schnitt (Dicke 40 μm) durch die Äquatorialebene eines Pellets von *S. commune*.

**Tab. A.7:** Morphologische Parameter bei Automatisierung der Mikroskopie in Abhängigkeit der Belichtungsdauer der Zeitreihenaufnahmen (t) und der eingestellten Förderrate der Pumpe (Durchflussrate  $\dot{Q}$ ). Angaben zur Versuchsdurchführung siehe Kapitel 2.3.2 und Kapitel 3.3. PPF = projizierte Pelletfläche, H = Homogenität der Pelletgrößenverteilung, S = Rauheit, R = Rundheit, G = Grauwert, PK = Pelletkonzentration.

A = Automatisierung / Mikroskopie im Durchfluss mittels Zeitreihenaufnahmen

B = Mikroskopie per Hand in Petrischale

	t [ms]	$\dot{Q}$ [mL/min]	PPF [mm <sup>2</sup> ]	H [-]	S [-]	R [-]	G [-]	PK [1/mL]
<b>A</b>	0,4	200	5,332	1,644	0,800	0,737	40,027	126
	0,4	300	7,011	1,601	0,819	0,753	42,362	152
	0,4	400	6,308	1,429	0,836	0,744	42,431	154
	1,0	200	8,963	1,636	0,773	0,772	78,580	135
	1,0	300	6,774	1,480	0,812	0,715	76,066	140
	1,0	400	7,691	1,450	0,822	0,714	77,814	136
	1,6	200	8,884	1,631	0,775	0,722	91,164	117
	1,6	300	9,616	1,407	0,807	0,668	85,647	121
	1,6	400	8,320	1,374	0,822	0,676	84,566	108
<b>B</b>	1,0	-	7,024	1,529	0,742	0,776	81,021	315

**Tab. A.8:** Folgende Polynome beschreiben die Abhängigkeit verschiedener Zielgrößen  $\Delta Y_i$  ( $\Delta$ PPF: projizierte Pelletfläche;  $\Delta$ S: Rauheit;  $\Delta$ G: Grauwert;  $\Delta$ R: Rundheit;  $\Delta$ H: Homogenität) von bei Mikroskopie im Durchfluss eingestellten Parametern ( $\dot{Q}$ : Förderrate der Pumpe in mL/min; t: Belichtungsdauer der Kamera in ms). Die Zielgrößen  $\Delta Y_i$  geben die Werte morphologischer Parameter im Durchfluss abzüglich in händischer Mikroskopie gemessener Werte für dieselben Pellets an. Die Berechnung der Polynome erfolgte mittels multipler linearer Regression. Die in Kap. 3.3 in Abbildung 3.43 dargestellten Konturplots werden von den Polynomen beschrieben. Koeffizienten, die bei Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,20 nicht signifikant waren, wurden gelöscht.

#### Polynom

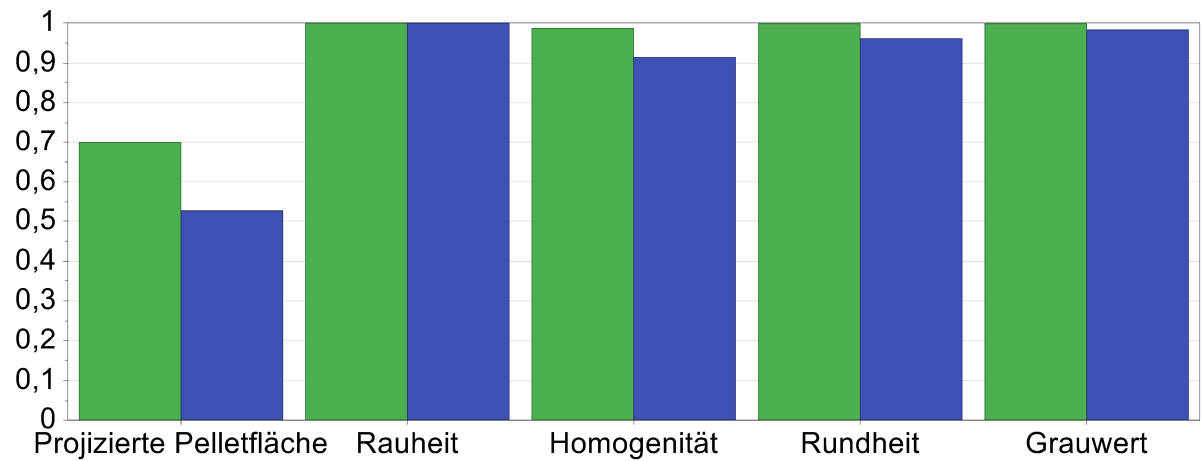
$$\Delta \text{PPF} = -1,64 + 2,27 \cdot t$$

$$\Delta S = -0,12 + 1,15 \cdot 10^{-3} \cdot \dot{Q} - 3,61 \cdot 10^{-2} \cdot t - 1,50 \cdot 10^{-6} \cdot \dot{Q}^2 + 1,39 \cdot 10^{-2} \cdot t^2 - 2,17 \cdot 10^{-10} \cdot \dot{Q} \cdot t$$

$$\Delta G = -77,74 - 3,51 \cdot 10^{-2} \cdot \dot{Q} + 122,06 \cdot t + 1,07 \cdot 10^{-4} \cdot \dot{Q}^2 - 36,44 \cdot t^2 - 3,75 \cdot 10^{-2} \cdot \dot{Q} \cdot t$$

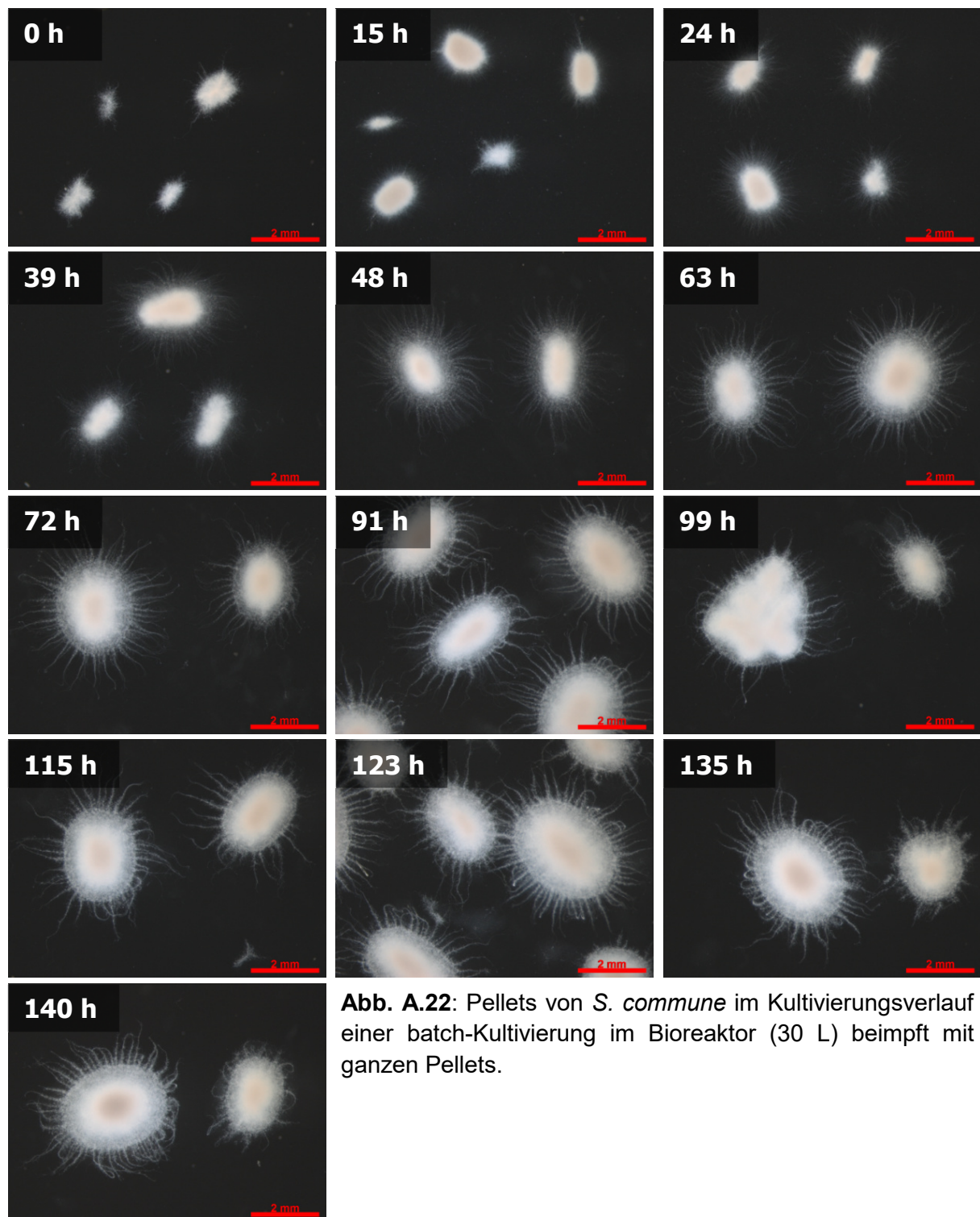
$$\Delta R = 0,41 - 2,32 \cdot 10^{-3} \cdot \dot{Q} - 8,77 \cdot 10^{-2} \cdot t + 3,14 \cdot 10^{-6} \cdot \dot{Q}^2 - 9,92 \cdot 10^{-3} \cdot t^2 + 1,19 \cdot 10^{-4} \cdot \dot{Q} \cdot t$$

$$\Delta H = 0,94 - 5,90 \cdot 10^{-3} \cdot \dot{Q} + 1,33 \cdot 10^{-1} \cdot t + 8,00 \cdot 10^{-6} \cdot \dot{Q}^2 - 8,33 \cdot 10^{-2} \cdot t^2$$

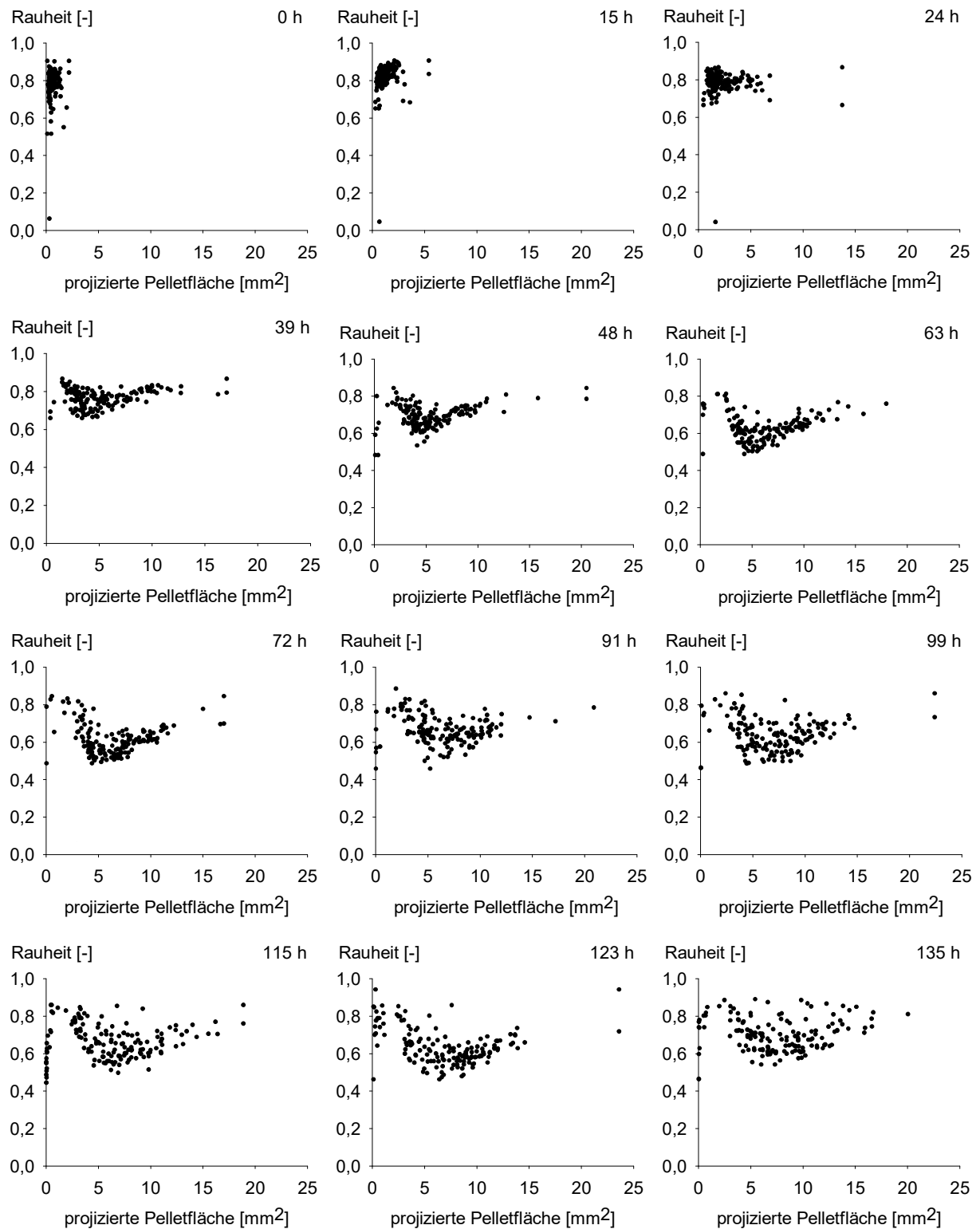


**Abb. A.21:** Korrelationskoeffizient  $R^2$  (grün) und Vorhersagegüte  $Q^2$  (blau) für mittels multipler linearer Regression (MLR) errechnete Modelle für die Abweichung verschiedener morphologischer Parameter zwischen Mikroskopie im Durchfluss (Automatisierung) und händischer Mikroskopie in Abhängigkeit von Belichtungsdauer und Durchflussrate.



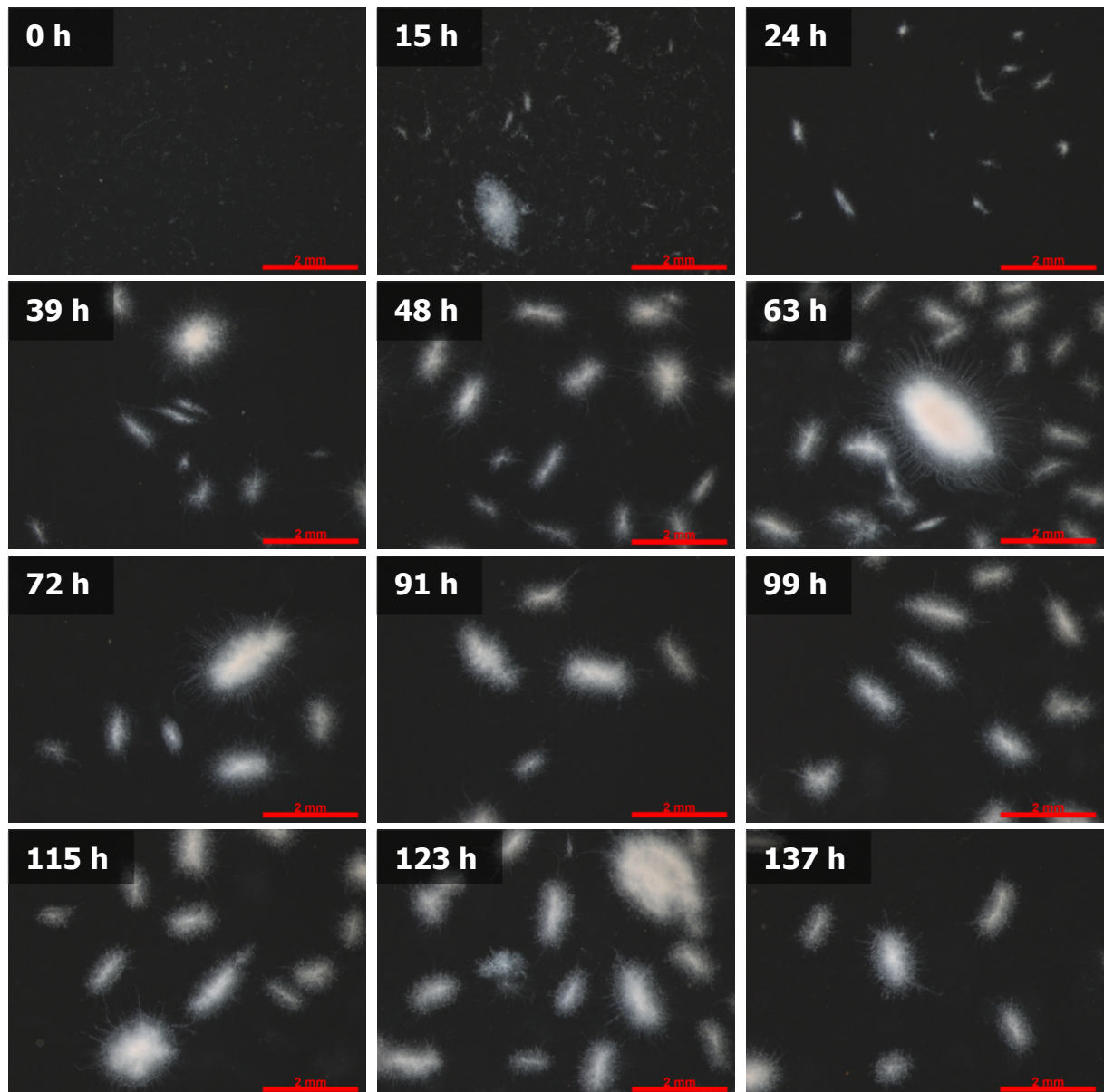


**Abb. A.22:** Pellets von *S. commune* im Kultivierungsverlauf einer batch-Kultivierung im Bioreaktor (30 L) beimpft mit ganzen Pellets.

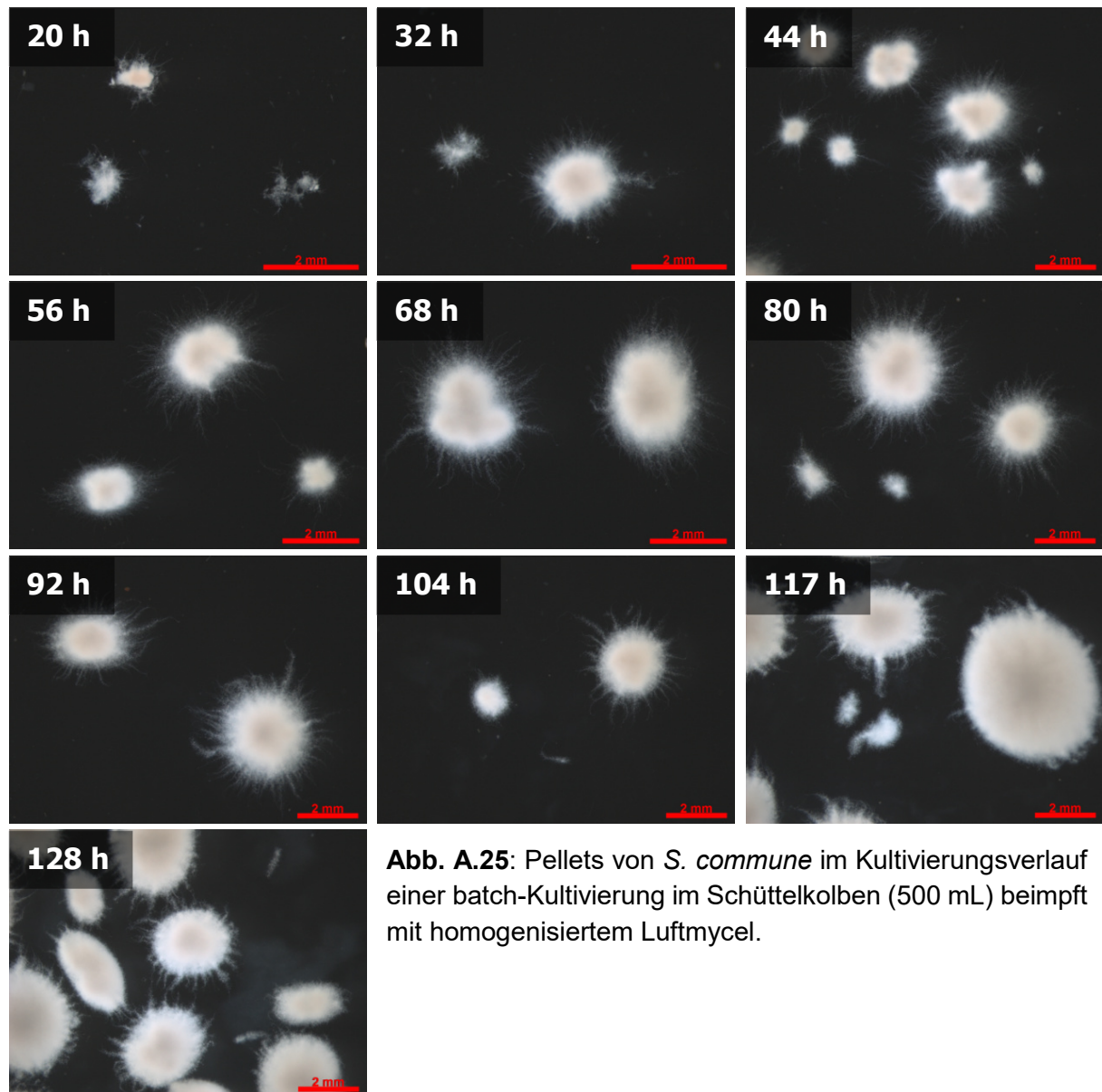


**Abb. A.23:** Verteilung der Rauheit über der projizierten Pelletfläche von jeweils 150 Einzelpellets von *S. commune* je Probenahmezeitpunkt. Alle Proben aus Reaktorkultivierung (30 L), die durch Inokulation mit ganzen Pellets gestartet wurde.





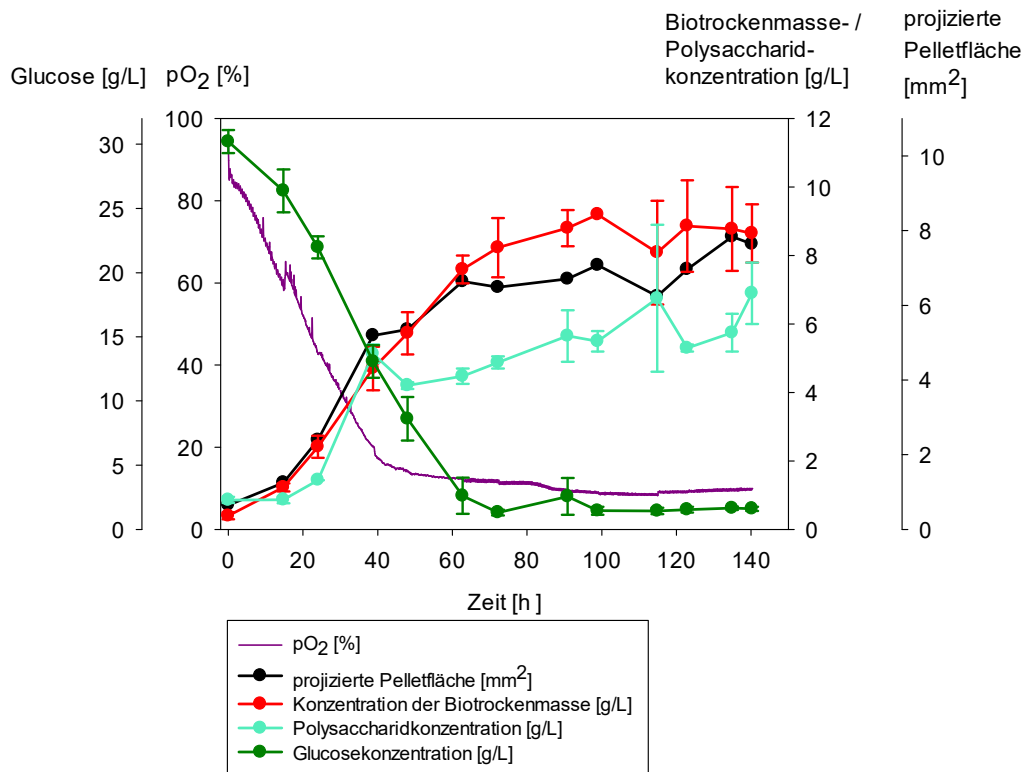
**Abb. A.24:** Pellets von *S. commune* im Kultivierungsverlauf einer batch-Kultivierung im Bioreaktor (30 L) beimpft mit homogenisierter Kultursuspension.



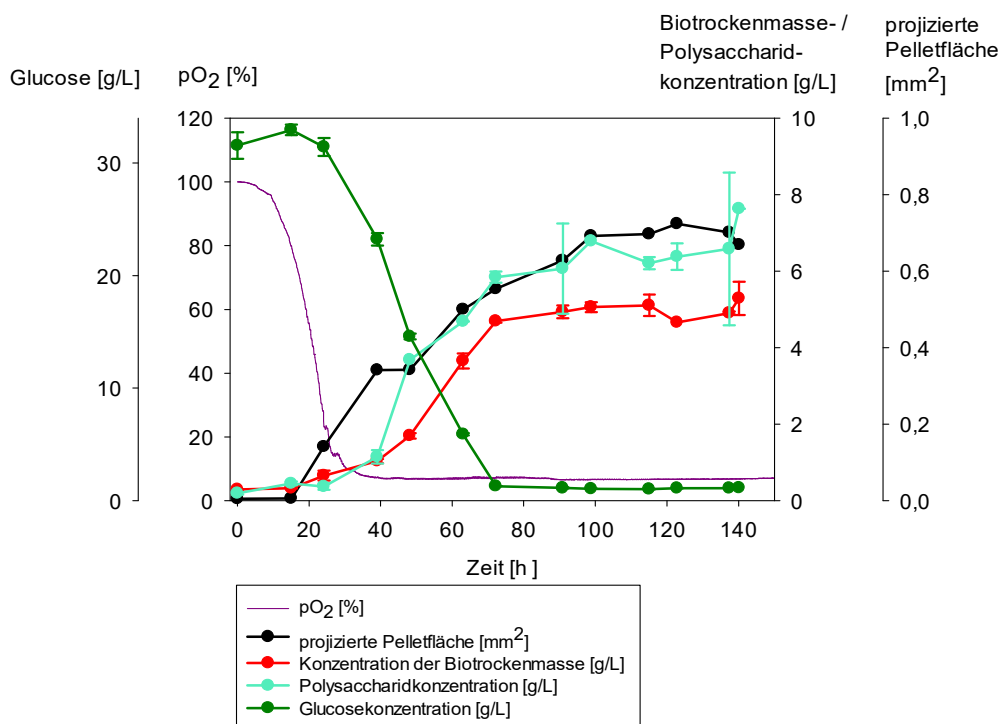
**Abb. A.25:** Pellets von *S. commune* im Kultivierungsverlauf einer batch-Kultivierung im Schüttelkolben (500 mL) beimpft mit homogenisiertem Luftmycel.

**Tab. A.9:** Fläche des Pelletbereichs mit geringer Biomassedichte, abgeschätzt aus Differenz der Pelletfläche bei Wahl von zwei verschiedenen Graustufengrenzwerten ( $\Delta\text{PPF}_{\text{th7-100}}$ ) im Verlauf einer Reaktorkultivierung (30 L), die mit ganzen Pellets beimpft wurde. Des Weiteren projizierte Pelletfläche, Biomassedichte der Pellets (pelletvolumen-spezifische Biotrockenmasse (BTM)) sowie auf das Pelletvolumen bezogene Menge an gebildetem Polysaccharid (PS), die aus der aktuellen Änderung der Polysaccharidkonzentration zu den Kultivierungszeitpunkten berechnet wurde.

<b>Zeitpunkt Probenahme</b>	<b><math>\Delta\text{PPF}_{\text{th7-100}}</math></b>	<b>projizierte Pelletfläche</b>	<b>pelletvol.sp. BTM</b>	<b>pelletvol.sp. gebildetes PS</b>
<b>[h]</b>	<b>[mm<sup>2</sup>]</b>	<b>[mm<sup>2</sup>]</b>	<b>[<math>\mu\text{g}_{\text{BTM}}/\text{mm}_\text{P}^3</math>]</b>	<b>[<math>\Delta\text{ng}_{\text{PS}}/\text{mm}_\text{P}^3</math>]</b>
0	0,44	0,65	0,93 ± 0,24	2,30
14,75	0,80	1,25	1,30 ± 0,12	94,40
24,00	1,67	2,39	1,33 ± 0,18	66,97
38,75	3,63	5,20	0,69 ± 0,09	13,43
48,00	3,75	5,35	0,96 ± 0,10	10,53
62,75	4,34	6,64	0,77 ± 0,04	3,45
72,25	4,27	6,48	0,90 ± 0,09	2,43
90,90	4,26	6,71	0,97 ± 0,06	1,22
98,90	4,71	7,08	0,85 ± 0,00	0,77
114,90	3,83	6,25	0,93 ± 0,17	0,58
122,90	4,40	6,97	0,90 ± 0,14	0,41
134,90	4,75	7,84	0,68 ± 0,09	0,23
140,25	4,64	7,65	0,66 ± 0,06	0,20



**Abb. A.26:** Projizierte Pelletfläche, Glucose-, Biotrockenmasse- sowie Polysaccharidkonzentration und Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) bei Kultivierung von *S. commune* im batch-Verfahren im 30 L Bioreaktor. Kultivierung durch Beimpfen mit ganzen Pellets gestartet.

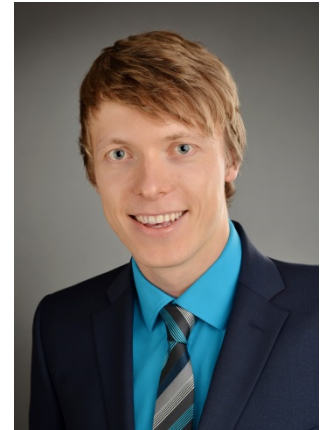


**Abb. A.27:** Projizierte Pelletfläche, Glucose-, Biotrockenmasse- sowie Polysaccharidkonzentration und Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) bei Kultivierung von *S. commune* im batch-Verfahren im 30 L Bioreaktor. Kultivierung durch Beimpfen mit homogenisierter Kultursuspension gestartet.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Lars-Roland Freund  
Geburtsdatum: 07.07.1986  
Wohnort: 79822 Titisee-Neustadt  
Straße: Richard-Schirrmann-Str. 25  
Telefon: 0174 688 77 59  
E-Mail: la.freund@hotmail.de  
Familienstand: verheiratet, ein Kind



## Berufserfahrung

seit 07/2017 Stellv. Laborleitung bei G+B Kalibriertechnik GmbH  
01/2016 – 06/2017 Projektingenieur Qualifizierung und Validierung pharmazeutischer Anlagen bei Novartis Pharma Produktions GmbH im Auftrag der Testo industrial services GmbH

## Akademische Laufbahn

15/05/2012 – 12/2015 Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie  
04/2012 – 05/2012 TU Braunschweig, Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie Wissenschaftliche Hilfskraft  
03/2012 Masterabschluss Biotechnologie an der TU Braunschweig  
04/2011 – 03/2012 Masterstudium der Biotechnologie an der TU Braunschweig

09/2010 – 03/2011	Akademisches Auslandssemester mit ERASMUS-Förderung an der Universität von Umeå, Schweden
10/2009 – 08/2010	Masterstudium der Biotechnologie mit Schwerpunkt Bioprozesstechnik an der TU Braunschweig
07/2009	Bachelorabschluss Biotechnologie an der TU Braunschweig
10/2006 – 07/2009	Bachelorstudium der Biotechnologie mit Schwerpunkt Bioprozesstechnik an der TU Braunschweig

## Praktika

### Studentische Hilfskraft während des Studiums:

11/2011 – 03/2012	TU Braunschweig, Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie „Erarbeitung eines Projektantrags (Promotionsvorschlag) zur Untersuchung maßgeschneiderter Ansteuerung der Morphologie filamentöser Pilze“
05/2010 – 07/2010	TU Braunschweig, Institut für Technische Chemie „Verfassen von Praktikumsskripten (instrumentelle Analytik)“
06/2009 – 04/2010	TU Braunschweig, Institut für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik, Abteilung Biotechnologie „Literaturrecherche und Tests zu online-analytischen Methoden für die Charakterisierung von Pilzpellets“
09/2008 – 12/2008	TU Braunschweig, Institut für Technische Chemie „Produktion und präparative chromatographische Aufreinigung von Oligosacchariden“

### Praktika:

10/2010 – 02/2011	Auslandspraktikum bei Processum Biorefinery Initiative AB, Örnsköldsvik, Schweden; Untersuchungen zu „Capability of <i>Pichia stipitis</i> to ferment inhibitory lignocellulose hydrolysates“
-------------------	---

## Schulbildung

06/2006	Abitur am Werner-Heisenberg-Gymnasium Weinheim
---------	--

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

**Konferenzbeitrag:** Posterpräsentation auf dem „Global Biotechnology Congress“, 06/2014, Boston, USA  
„Opportunities in the cultivation of non-sporulating filamentous fungi by morphology control“

## Besondere Qualifikationen

Umfassende Kenntnisse von der Planung bis zur Ergebnispräsentation bei Screening- und Optimierungsaufgaben: Design of Experiments (DoE), Quality by Design

Gute Kenntnisse in Multivariater Datenanalyse (PCA, PLS, PLS-DA)

Gute Kenntnisse in der Automatisierung: Entwicklung von online-Mikroskopie-Systemen in Fest-Flüssig-Handling Prozessen mit Implementierung von automatisierten Auswerteroutinen mittels ImageJ (Java-basiert)

Praktische Erfahrungen in batch- und fedbatch-Fermentationen von der Mikrotiterplatte, über den Schüttelkolbenmaßstab bis in verschiedene Reaktormaßstäbe (3 - 300 L)

Kenntnisse der Querstromfiltration mit Keramikröhrenfiltern zur Zellabtrennung aus Fermentationsbrühen sowie zur Produktaufreinigung

Softwarekenntnisse: SigmaPlot, SIMCA (PCA, PLS, PLS-DA), MODDE (DoE), Minitab, Agile PLM, MS Office, MS Project

Qualifizierung von Pharmaanlagen nach GMP-Standards

Kalibrierung: Entwicklung neuer Kalibrierverfahren nach DIN EN ISO 17025

## Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend in Wort und Schrift), Schwedisch (fundierte Grundkenntnisse), Französisch (Grundkenntnisse)